

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**Detección molecular de secuencias nucleotídicas con
alto contenido de citosinas en el gen Fmr1**

TESIS

Para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo

AUTOR

Demetrio Saul Lindo Samanamud

ASESOR

Pilar Elena Mazzetti Soler

Lima-Perú

2012

A mis padres, hermano Pedro, primo Freddy, tía Julia, tíos Jorge y Cesar porque contribuyeron en que saliera adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzado este objetivo, ya que siempre estuvieron motivándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir y seguir alcanzando objetivos trazados. Esto es para ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

A mis amigos del laboratorio de Neurogenética mi otra familia. Gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

A todos Ustedes, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

Agradecimientos

Dra. Pilar Elena Mazzetti Soler. Médica neuróloga, jefa del Servicio y Centro de Investigación en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN). Por el asesoramiento temático en enfermedades Neurogenéticas y su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la realización de este trabajo.

Med. Mario Reynaldo Cornejo Olivas. Investigador del Servicio y Centro de Investigación en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN), por sus valiosas sugerencias, críticas y acertados aportes durante la revisión del proyecto e informe final de tesis además de los consejos que me brindan en el desarrollo de mi perfil profesional.

Blgo. Gerardo Olimpio Ortega Davila. Investigador del Servicio y Centro de Investigación en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN), por el entrenamiento en el manejo de técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de enfermedades Neurogenéticas, por su simpatía, compañerismo al compartir inquietudes, éxitos durante la realización de los experimentos y consejos que me brindan en el desarrollo de mi perfil profesional.

Ing. María Ysabel Victoria Marca. Investigador del Servicio y Centro de Investigación en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN), por el entrenamiento en el manejo de técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de enfermedades Neurogenéticas, por su presencia amistad incondicional y consejos que me brindan en el desarrollo de mi perfil profesional y vida personal.

Lic. Rita Abanto Rojas por su permanente disposición, desinteresada ayuda y consejos que me brindan en el desarrollo de mi perfil profesional.

CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCION.....	5
MARCO TEORICO.....	7
II OBJETIVOS.....	26
III METODOS.....	27
IV RESULTADO.....	34
V DISCUSION.....	42
VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	49
VII REFERENCIAS.....	51
VIII ANEXOS	
ANEXO 1: Estructuras alternativas del DNA.....	56
ANEXO 2: Procedimiento desarrollado en la implementación de la técnica.....	57
ANEXO 3:Estrategia de amplificación con los cebadores diseñados.....	58
ANEXO 4: Soluciones utilizadas en los protocolos	59
ANEXO 5: Resolución de aceptación de proyecto	60
ANEXO 6: Consentimiento Informado.....	62

ABREVIATURAS

ng:	Nanogramo
µg:	Microgramo
µL:	Microlitro
bP:	Pares de bases
DNA:	Acido desoxiribonucleico
dNTP:	Desoxinucleotidos 5'-trifosfato
EDTA:	Acido etilenodiaminotetracético
FMR1:	Fragile X Mental Retardation 1
FMRP:	Fragile X Mental Retardation Protein
Isla CpG:	Regiones que tiende a metilarse
Imprinting:	Genes que se expresan de acuerdo al sexo del progenitor
M:	Molar
Min:	Minuto
mL:	Militro
RNA:	Acido ribonuceico
mRNA:	RNA mensajero
°C:	Grados celcius
dG:	Energía libre de Gibbs
nM:	Nanometro

RESUMEN

Varios microsatélites inestables se caracterizan por la presencia de nucleótidos de citosinas en sus unidades de repetición; adoptan estructuras de DNA alternativas a la convencional y en algunos casos, involucran procesos de metilación. El genotipado de tripletes por PCR convencional se fundamenta en la denaturación del DNA y posterior amplificación del triplete repetido. Sin embargo, debido las estructuras alternativas que adoptan estos microsatélites, las reacciones de denaturación y amplificación son ineficientes.

En este trabajo desarrollo una alternativa de diagnóstico por PCR para secuencias ricas en citosinas (metiladas y no metiladas) basada en modificación nucleotídica. *Previo* consentimiento se modificó el gen del retardo mental ligado al fragilidad del cromosoma X tipo 1, cuya siglas en ingles es *FMR1* (Fragile X Mental Retardation 1) de ocho individuos normales (cuatro mujeres y cuatro varones) empleando bisulfito de sodio, cambiando las citosinas en uracilo. Posteriormente, con el uso de bioinformática, se realizó: 1) La simulación de las estructuras alternativas que adopta el microsatélite inestable contenido en la región 5'-UTR del gen. 2) Luego de la ubicación de las islas CpG, se generaron cebadores específicos que hibriden con el microsatélite modificado (Primer T) y cebadores específicos que hibriden con una secuencia modificada del gen *FMR1* que contiene las islas CpG (Primer M). Finalmente, ambas secuencias fueron amplificadas por PCR convencional.

La modificación del DNA fue evidenciada por espectrofotometría al uracilo, luego de tratamiento químico con bisulfito de sodio. La estructura que fue evidenciada por métodos bioinformaticos fue la estructura llamada *hairpins* (Horquillas). Se encontraron dos potenciales islas CpG en la región estudiada. La amplificación con los cebadores T confirmó el diseño *in silico* desarrollado para abordar la estructura en *hairpins* y el efecto que ejerce la modificación sobre este tipo de estructura. La amplificación con los cebadores M permitió detectar metilación de la primera isla CpG del gen *FMR1* en el cromosoma x inactivo.

En conclusión se desarrolló un método alternativo para amplificación de secuencias de microsatélite en rango normal, que contengan citosinas metiladas y no metiladas, que permite la amplificación mediante PCR. Se requieren estudios posteriores con muestras de DNA que contengan microsatélites anormalmente expandidos (metilados y no metilados) para validar su aplicación clínica diagnóstica.

Palabras clave: metilación, modificación nucleotídica, tripletes repetidos

ABSTRACT

Many unstable microsatellites are characterized by presenting cytosine nucleotides in their repeat units, adopting alternative DNA structures and, in some cases, are involved in methylation processes. Triplet sequences genotyping by PCR methodology is based on DNA denaturation and amplification of the unstable microsatellite. However, due to alternative structures adopted by microsatellites, denaturation and amplification processes are inefficient. This thesis developed an alternative PCR genotyping method for cytosine rich sequences (methylated and unmethylated) based on nucleotide modification.

After appropriate informed consent, the *FMR1* gene from 8 healthy subjects (four male and four female) was modified with sodium bisulfite. Subsequently, using bioinformatics tools, we performed: 1) simulation of alternative structures of the unstable microsatellite in the 5'-UTR region of the gene. 2) After localization of the CpG islands, we generated specific primers which hybridize with the modified microsatellite (Primers T) and specific primers that hybridize to a new sequence of the *FMR1* gene containing CpG islands (Primers M). Finally, both of these sequences were amplified by PCR.

Modified DNA was obtained after chemical treatment with sodium bisulfite. Alternative structures of the sequence of the microsatellite were characterized. CpG islands of the gene, that can be methylated, were identified. Amplification confirmed expected results obtained previously by bioinformatics analysis. The T primers amplified the modified microsatellite of the *FMR1* gene. The M primers amplified the modified sequence containing the CpG Island of the gene.

In conclusion, we developed a potential alternative genotyping method for amplification of microsatellite sequences carrying methylated and unmethylated cytosine. Further studies are needed in DNA samples from individual with abnormally expanded microsatellites both methylated and unmethylated to validate clinical application.

Key words: methylation, nucleotide modification, triplet repeats

INTRODUCCION

La aparición de un tipo nuevo de mutación se hizo evidente a partir del año 1991, con el descubrimiento de una secuencia inestable de tripletes repetidos en el gen responsable del Síndrome de X Frágil, en el que el número de tripletes repetidos varía de generación en generación (1). En el genoma eucariota estas secuencias de DNA repetitivo, especialmente los microsatélites inestables, se caracterizan por la presencia de una citosina en sus unidades de repetición y adoptan conformaciones de estructuras de DNA alternativas a la convencional, que estarían relacionadas con la inestabilidad de la mutación y a algunos procesos de metilación (2). Existen alrededor de 40 mutaciones asociadas a secuencias repetitivas conocidas como mutaciones dinámicas, destacando los fenotipos asociados a neurodegeneración (3).

El diagnóstico molecular de estas enfermedades se basa en la cuantificación de las unidades repetitivas en el gen responsable, utilizando metodologías de reacción

de cadena de la polimerasa (PCR), secuenciamiento y Southern blot. Las dos primeras metodologías se fundamentan en el uso de una cadena de DNA, previamente denaturado, como plantilla para generar múltiples copias de las secuencias de interés utilizando enzimas polimerasas; sin embargo, la denaturación y amplificación de los tripletes pueden ser ineficientes debido al gran número de tripletes y las estructuras alternativas que forman estas secuencias (4).

La metodología de Southern blot detecta la presencia de secuencias de microsatélites inestables utilizando enzimas de restricción que cortan el DNA de interés, seguido de una separación de los fragmentos de DNA de acuerdo a su longitud por electroforesis en gel de agarosa. Se transfiere luego los fragmentos migrados a una membrana, en la cual se efectúa la hibridación con un oligonucleótido marcado por fluorescencia o radioactividad. Debido a que el Southern blot es una técnica que no utiliza la denaturación del DNA y la enzima polimerasa se considera el estándar de oro para el análisis de tripletes repetidos; pero su aplicación demanda mayor tiempo de trabajo en el laboratorio, es compleja y con costos elevados ya que requiere manejo de instalaciones y equipos especializados para uso de radioactividad o fluorescencia (5).

Por estudios realizados en epigenética, se ha logrado inducir la conversión de citosina a uracilo mediante reacciones de oxidación para así evaluar las regiones del DNA que presentan metilaciones o desmetilaciones, como ocurre con la metilación aberrante de regiones promotoras de genes supresores de tumores (6). La conversión de las citosinas contenidas en estos tripletes podría limitar la formación de estructuras alternativas de DNA y facilitar la amplificación de estas secuencias mediante PCR.

Este estudio propone la estandarización de una técnica de modificación de las citosinas metiladas y no metiladas para detectar tripletes CGG en el gen *FMR1* humano, facilitando la metodología de PCR convencional.

I MARCO TEORICO

El genoma de los organismos eucariotas es complejo y está conformado por secuencias de tipo único y secuencias repetitivas (7). En eucariotas inferiores y superiores estas secuencias representan el 80% y entre el 50 al 70 %, respectivamente. La tasa de mutación entre las secuencias de tipo único y las secuencias repetitivas es variable, aunque es mayor en las secuencias repetitivas (8).

1. DNA REPETITIVO DEL GENOMA HUMANO

El DNA repetitivo se define como fragmentos de secuencias nucleotídicas que se encuentran repetidas en bloque a lo largo del genoma y constituyen entre un 20 y 50% del genoma. Estas repeticiones se encuentran dispersas por todo el genoma nuclear, ya sea mezcladas con las secuencias de DNA único o agrupadas (9) y se han clasificado en función de su carácter codificante y de repetitividad, en DNA repetitivo codificante y no codificante. El DNA repetitivo codificante y no codificante tienen posiblemente un origen evolutivo; en el caso de DNA repetitivo agrupado, el mecanismo de origen podría ser por errores en la replicación o en la recombinación genética, y en el caso del DNA repetitivo disperso tal vez se deba a translocaciones o transposiciones cromosómicas (10).

1.1. DNA repetitivo codificante

Familias de genes cuyas secuencias nucleotídicas presentan homología; se originaron mediante duplicaciones y variaciones de un gen ancestral. Pueden encontrarse agrupado o disperso.

1.1.1. DNA repetitivo codificante agrupado: Estos incluyen:

1.1.2. a) Familias de genes repetitivos en tándem, que son secuencias con alto grado de homología indicando su relación evolutiva y funcional. Como ejemplo tenemos a los genes codificantes de histonas, RNA ribosómicos y de transferencia (9).

1.1.3. b) Familias multigénicas con genes agrupados, están formados por genes con homología de secuencia en regiones, que dan origen a proteínas con grandes regiones de secuencia y estructuras comunes (dominios) (11) y familias con secuencia de homología escasa, generan proteínas con pequeños motivos comunes (pocos aminoácidos comunes) (12). También incluye a la superfamilia de genes con una homología de secuencia muy débil y pocos dominios comunes en las proteínas por lo que estos genes tienen una relación evolutiva más distante (9).

1.1.4. DNA repetitivo codificante disperso: Las familias multigénicas se encuentran dispersas por el genoma, incluso en cromosomas distintos, como en el caso de la familia del gen de la aldolasa que comprende tres genes funcionales y dos pseudogenes distribuidos en cinco cromosomas (13).

1.2. DNA repetitivo no codificante:

1.2.1. Secuencias repetitivas agrupadas de tamaño grande o DNA satélite: Son llamadas también DNA repetitivo en tándem, está formado por unidades de repetición con tamaños que van desde 5 a 171 bp que se repiten entre 1 000 a 1 000 000 de veces. Se ubican principalmente en centrómeros y telómeros (14). No se debe confundir con el término satélite cromosómico ya que estos corresponden a pequeñas masas de cromatina que forman el extremo de los brazos cortos de un cromosoma acrocéntrico.

1.2.2. Secuencia repetitiva dispersa, de tamaño moderado: Se distribuyen a lo largo del genoma, con repeticiones que van desde 100 a 10 000 veces. Se agrupan en:

a) *Minisatélites*: que están formados por unidades de repeticiones de 6 a 64 bp, ricas en guanina y citosina, agrupadas en tándem formando bloques relativamente grandes que se repiten desde cientos a miles (12).

b) *Microsatélites*, Son una clase de secuencias en tándem cuya unidad de repetición está constituida por menos de 5 nucleótidos; estas unidades se repiten en un rango de 6 a 52 veces (14). Los microsatélites son considerados una fuente de variación genética y de adaptación evolutiva y su función estaría relacionada a la organización de la cromatina, replicación, reparación, regulación de la actividad génica, ciclo celular y recombinación (14,15, 16). Se agrupan de acuerdo a la unidad de repetición: a) Mononucleótidos, que son los más comunes en el genoma humano y están representados por las colas de poli A (17). b) Dinucleótido que en orden de frecuencia son CA, AT, y AG respectivamente (17).

c) Trinucleótidos o repeticiones trinucleotídicas (TNR, *trinucleotide repeats*) cuyas secuencias más comunes son CAG y AAT (18, 19).

1.2.3. En la actualidad la clasificación de los microsatélites con respecto al DNA repetitivo no se encuentra bien establecida, debido a que se pueden encontrar tanto en la regiones codificantes como no codificantes. Los minisatélites y microsatélites son de utilidad en pruebas de identificación y estudios familiares debido a su alta variabilidad entre individuos(16).

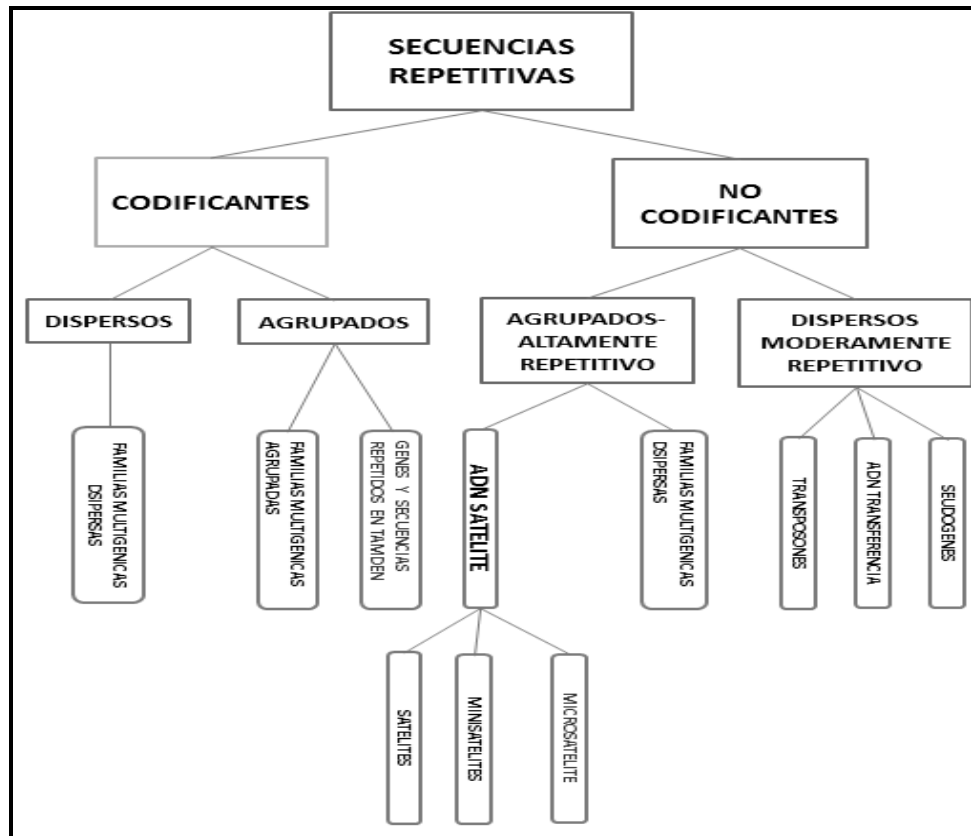


Figura 1. Estructuración de las secuencias repetitivas (adaptado y traducido de Strachan and Read. Human Molecular Genetics. 2010) Modificado por el autor para mostrar la ubicación de los tripletes repetidos.

2. SECUENCIAS REPETITIVAS Y ENFERMEDADES HUMANAS

Existe un grupo de enfermedades genéticas asociadas a secuencias repetitivas, ya sea minisatélites o microsatélites inestables. Se han descrito enfermedades asociadas a minisatélites como la fragilidad del cromosoma 16, producida por expansión inestable de la secuencia AT (20) o la epilepsia mioclónica progresiva tipo 1, asociada a la expansión del minisatélite GC (21). Sin embargo, las secuencias repetitivas más asociadas a la patología en el ser humano son los microsatélites inestables por trinucleotidos (22).

2.1. Tripletes repetidos

En personas no afectadas, los microsatélites formados por trinucleótidos o tripletes repetidos son altamente polimórficos en el número de repeticiones, siendo estables de generación en generación. En el genoma humano existen cuatro tipos de tripletes repetidos asociados a enfermedades, estos son: CGG, CAG, CTG y GAA.

En personas afectadas el microsatélite contiene un número de tripletes repetidos que ha superado el rango normal. En este microsatélite durante la división celular el triplete se vuelve inestable en el número de repeticiones de una generación a otra, tanto en células somáticas como sexuales. Estos microsatélites se encuentran tanto en cromosomas autosómicos como en el cromosoma X y son de localización variable en el gen, encontrándose en las regiones no traducibles 5-UTR y 3-UTR, regiones promotoras, regiones exónicas e intrónicas (Figura II). Algunos tripletes repetidos están interrumpidos internamente por nucleótidos llamados interrupciones, estas son diferentes a la secuencia repetida y en estudios realizados en este tipo de interrupciones se ha encontrado que estarían involucradas en la regulación de la producción del transcrito (23). Muchas de las enfermedades por tripletes repetidos tienden a incrementarlos de tamaño de generación en generación con fenotipos más severos de la enfermedad y menor edad de inicio, a este fenómeno se le conoce como anticipación génica.

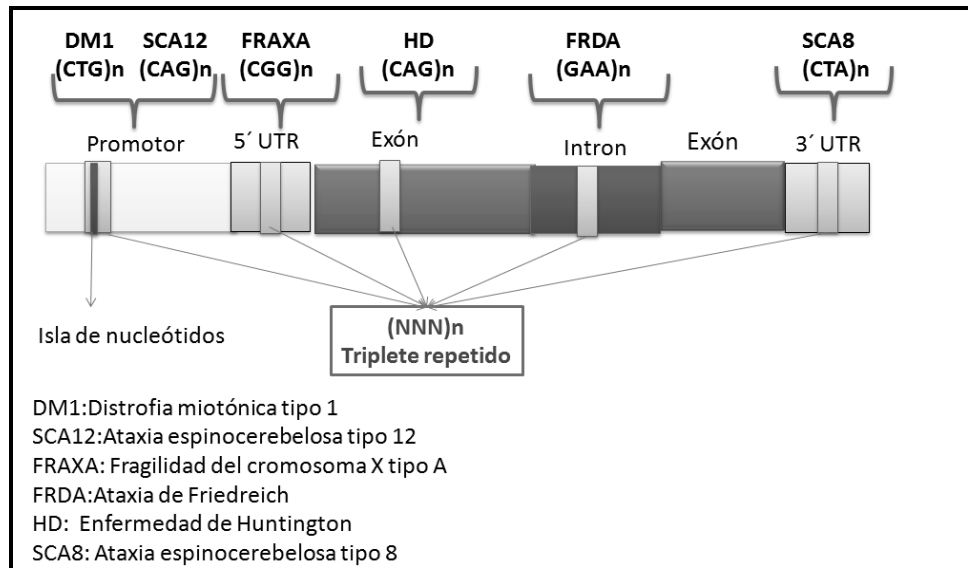


Figura II. Representación gráfica de un gen conteniendo tripletes repetidos (Tomado y adaptado de Pearson CE, y col. Nature Reviews Genetics. 2005).

De acuerdo al tamaño de la expansión del triplete las mutaciones por tripletes repetidos se clasifican en:

- a) Las mutaciones completas se caracterizan por presentar muchas unidades de repeticiones. El término de mutación completa se refiere aquellos tipos de mutaciones donde la manifestación clínica de la enfermedad es severa, motivo por el cual el punto de corte donde empieza una mutación completa varía para cada enfermedad de este tipo. Estas mutaciones generan trastornos multisistémicos, ya que involucran la disfunción y/o degeneración de diferentes tejidos
- b) Las mutaciones intermedias o premutaciones son aquellas donde la cantidad de la unidad repetitiva es inferior a la cantidad existente en una mutación completa, el punto de corte para empezar a clasificarlas varía para cada enfermedad de este tipo: estas mutaciones se caracterizan por ser clínicamente silentes pero con una marcada tendencia a expandirse a mutaciones completas durante la transmisión por una línea germinal (14). Como dato adicional se sabe que las mutaciones de tripletes repetidos

de regiones no codificantes tienen un mayor número de repeticiones que aquellas ubicadas en regiones codificantes (24).

De acuerdo a la función del triplete las mutaciones por tripletes repetidos se clasifican en:

- a) Mutaciones que generan ausencia de traducción del DNA: Este tipo de mutación genera la ausencia, disminución o aumento de la cantidad o tamaño del transcrito, más no llegan a la etapa de traducción y por ende no forman proteína. Tenemos mutaciones completas ubicadas en las regiones no traducibles, intrones y promotores. Como ejemplo, tenemos el síndrome X frágil, en el que la mutación completa del triplete CGG, ubicada en la región no traducible del gen, produce metilación de la región promotora del gen *FMR1* y su consecuente inactivación; la ataxia tipo 12 (SCA12), donde la expansión del triplete CAG está ubicada en la región promotora (24) y finalmente, la ataxia de Friedreich en la que la expansión del triplete ocurre en la región intrónica, que adquiere una estructura de DNA 'pegajoso' que interfiere con la transcripción del gen frataxina (14). También tenemos mutaciones intermedias, como en el síndrome de temblor/ataxia (FXTAS) donde hay un aumento de la cantidad del transcrito del gen *FMR1*(25), sin encontrarse una traducción completa. Una de las características a resaltar en este tipo de mutaciones es que en aquellas ubicadas en cromosomas autosómicos, se puede dar el fenómeno de haploinsuficiencia, fenómeno en el cual la proteína producida por una sola copia de un gen normal no es suficiente para garantizar una función normal en la célula.

- b) Mutaciones que generan ganancia de función: Causadas por mutaciones completas e intermedias, debidas a expansiones de tripletes localizadas en las regiones codificantes donde se transcriben y posteriormente se traducen a un segmento expandido de poliaminoácido. Existe evidencia de que estas secuencias aminoacídicas adoptan una conformación diferente, que en algunas vías contribuyen a su toxicidad neuronal; como ejemplo tenemos la enfermedad de Huntington y muchas de las ataxias espinocerebelosas (26).

3. ESTRUCTURAS ALTERNATIVAS DE LOS MICROSATÉLITES INESTABLES

Estudios realizados por Sinden y Wells en el año 2002, sugieren que la expansión masiva de los tripletes puede originar un truncamiento de la replicación del DNA debido a un bloqueo físico. El bloqueo físico de la replicación puede ser por una estructura conformacional alternativa del DNA, formada a partir de las repeticiones del triplete (27). Se ha observado que los tripletes repetidos generan un bloqueo en la replicación en *E. coli* (28).

Se describen estructuras alternativas al DNA convencional como el DNA flexible, DNA paralelo, DNA triplex, DNA cuádruplex, hairpins, estructuras cruciformes, *left-handed Z DNA* y DNA de cadena deslizada (29). No toda la secuencia de DNA forma estructuras alternativas, se requiere de elementos de simetría para su formación, entre las cuales destacan:

- a) Repeticiones directas: Son dos secuencias nucleotídica idénticas (o casi idénticas), a veces separados por una secuencia de DNA no repetitivo. Por ejemplo, 3'-TAGT. . . TAGT -5', 5'-ATCA... ATCA- 3'
- b) Repeticiones inversas: Es una secuencia de nucleótidos cuya secuencia complementaria inversa se encuentra dentro de la misma cadena corriente abajo y que tiene la capacidad de auto aparearse. Por ejemplo, 5'- GACTGC... GCAGTC - 3'.
- c) Cuasi palindrómicas: A diferencia de un DNA palindrómico donde ambas secuencias se leen igual por ambas direcciones, en la secuencia cuasi palindrómica ambas secuencias no se leen igual en ambas direcciones, por alguna diferencia de algunos pares de bases, que dan lugar a pequeños bucles. Estas estructuras tienen funciones similares a los palíndromos perfectos en el proceso de mutación y expresión de genes.
- d) DNA *mirror* (repeticiones en espejo): Es un segmento de secuencia delimitado por una base, que genera un centro de simetría en una sola cadena y donde los nucleótidos terminales son idénticos. Por ejemplo: la secuencia TACACG es la imagen especular de GCACAT (30).

Los tripletes repetidos poseen motivos de secuencia y elementos de simetría que dan mayor flexibilidad a la doble hélice y promueven la formación de varias estructuras alternativas de DNA (Tabla A). Entre ellas tenemos hairpins de cadena simple, triple y cuádruple, y deslizamiento de la cadena de DNA (Ver anexo 1). Estas estructuras se han podido visualizar y generan un patrón de migración característico en geles de poliacrilamida, atribuido al aumento de la flexibilidad de (CAG) n · (CTG) n y (CGG) n · (CCG) n (31).

Tabla A. Elementos de simetría de tripletes repetidos. RD: repetición directa, QP: cuasi palindrómica, RM: DNA en espejo, ss: DNA de cadena simple. Triplet repeat DNA structures and human genetic disease: dynamic mutations from dynamic DNA. Journal of biosciences. 2002;27(1):53–65.

Triplete repetido	Tipo de elementos de simetria	Estructura alternativa del DNA
CTG/GAC	RD, QP	Helice flexible, <i>hairpins mismatched</i> (ss), cadena de DNA deslizada
CGG/GCC	RD, QP	Helice flexible, <i>hairpins mismatched</i> (ss), cadena de DNA deslizada, DNA cuádruplex
GAA/CTT	RD, RM	DNA triple intramolecular, cadena de DNA deslizada

Otras de las características generadas por los tripletes repetidos es que en algunos casos las expansiones grandes dan lugar a una metilación anormal de los mismos, pese a que estos no se encuentren dentro de una región promotora (31).

4. METILACIONES NUCLEOTÍDICAS

Se estima que el 41 % del genoma está formado por citosinas y guaninas (CG), ubicadas principalmente en las regiones promotoras de algunos genes y conocidas como islas de CpG; algunas de éstas están relacionadas con el silenciamiento génico por metilación (32). Las islas CpG conforman aproximadamente un 40% de promotores de los genes de mamíferos y son regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfato; la "p" en CpG

representa que están enlazados por un fosfato. En la mayoría de casos, los genes que presentan en sus islas CpG los dinucleótidos CG desmetilados, se expresan. Esta observación sugiere que la metilación de los sitios CpG en los promotores de los genes puede inhibir la expresión del mismo gen (33). Existen islas CpG que se encuentran en los promotores de los genes de mantenimiento de la célula (genes *housekeeping*) que no se encuentran metilados, ya que existe un factor protector que evita esta metilación, lo que origina que estos genes tengan una expresión constante (34). Se conocen dos tipos de metilación:

- a) El primero, causado por la expansión nucleotídica de tripletes que ocurre en las regiones promotoras que contienen citosinas y guaninas, ocasionando como primer efecto que las islas CpG que contienen estas regiones promotoras, se metilen. Además, ocurre una metilación de las regiones repetitivas de citosinas a lo largo de la expansión trinucleotídica. Estos fenómenos se presentan en diversos trastornos como el Síndrome del X Frágil (FraxA, FraxE, FraxF) y síndrome de Jacobsen (FRA11B) (35). Además, hay evidencia que sugiere que existe metilación de regiones no promotoras en las expansiones nucleotídicas para las mutaciones de Distrofia Miotónica tipo I y Ataxias Espinocerebelosas (36).
- b) El segundo se basa en la metilación de la isla CpG sin que exista un cambio en la secuencia primaria (Epimutación). Este fenómeno se ha observado en la metilación aberrante de genes supresores de tumores (36).

En vertebrados, la metilación de citosina parece constituir un mecanismo importante para distinguir genes activos de los que no lo son; por ejemplo la inactivación cromosómica de los mamíferos es un proceso que ocurre en uno de los dos cromosomas X que se encuentra presente en las células somáticas de sexo

femenino. La función biológica de esta inactivación es la compensación de dosis génica que existe entre los cromosomas XX de una célula femenina y los cromosomas XY de una célula masculina, lo que hace posible que tanto la célula masculina como femenina tengan la misma cantidad de proteínas codificadas por sus cromosomas X (37) .

4.1. Inactivación del cromosoma X

El proceso de inactivación del cromosoma X es complejo y existen dos vías de inactivación, ya sea al azar o por *imprinting* o. Aunque ambas formas utilicen los mismos RNAs y enzimas silenciadoras, se diferencian en tiempo de aparición y mecanismo de acción.

El centro de inactivación de X (región XIC) controla el inicio y la propagación de la inactivación del X. La función de XIC depende del transcripto XIST que es expresado por el gen *XIST* el cual no codifica una proteína sino una molécula de RNA funcional, llamada XIST. Esta molécula es expresada en células que contienen al menos dos cromosomas X y normalmente no es expresada en células masculinas. Sin embargo, aunque XIST es esencial para iniciar la inactivación del cromosoma X, no se requiere de su presencia para conservar el estado de inactivación. El RNA XIST permanece exclusivamente en el núcleo y es capaz de inactivar el cromosoma a partir del cual fue producido (40 , 41).

Aunque en etapas muy tempranas del desarrollo, ambos cromosomas X son activos, la inactivación del X se inicia conforme las células comienzan a diferenciarse de los linajes totipotente y pluripotente, lo que ocurre en la etapa tardía de blástula en ratones y con mucha probabilidad también suceda así en

humanos. En cada célula del embrión femenino se elige para la inactivación uno de los dos cromosomas X parentales, pero la decisión para inactivar el cromosoma X de herencia paterna (Xp) o el X materno (Xm) suele ser aleatoria y por consiguiente varía de célula a célula.

El RNA XIST envuelve en *cis* un cromosoma X y desencadena una serie de eventos que conducen a la inactivación y mantenimiento de la misma. El primero de ellos es la metilación en K9 de la histona H3. Conforme se acumulan los transcritos de XIST, se observa la represión transcripcional de los genes ligados al cromosoma X. Posteriormente existe una hipoacetilación global de la histona y la incorporación de la macro histona H2A en los nucleosomas, siendo la metilación de las islas CpG el evento final (33). Este segundo evento asegura el mantenimiento de la inactivación del cromosoma X y para ello se necesita un sistema enzimático capaz de catalizar la metilación *de novo*, mantener el estado de metilación y eliminar los grupos metilo cuando sea necesario. Estas reacciones de metilación están catalizadas por las enzimas llamadas DNA metiltransferasas, y desmetilasas respectivamente (40).

La metilación y la represión génica natural están altamente relacionadas con el proceso de inaccesibilidad de los factores de transcripción a la cromatina y heterocromatina, donde muchos genes están silenciados. Estos procesos se deben a los grupos metilo que impiden el acoplamiento de los factores de transcripción, o por un grupo de proteínas que reconozcan a estos metilos y que se unan a ellos provocando que estas proteínas atraigan a otras, formándose un complejo represor que generan un silenciamiento génico natural (32).

4.2. Metilación del gen *FMR1*

El gen *FMR1* tiene un silenciamiento génico peculiar, encontrándose tanto un silenciamiento génico natural que está presente en las mujeres normales como un silenciamiento génico anormal cuando el gen *FMR1* alcanza un estado patológico de expansión del triplete CGG, tanto en mujeres como en varones. Este gen así hipermetilado se inactiva y por ende se desarrolla el síndrome del cromosoma X frágil tipo A (41). Pero así como el DNA puede modificarse de forma covalente, sin que varíe el apareamiento de bases, también puede ocurrir lo contrario, que exista modificaciones que originen cambios de nucleótidos (32).

5. MODIFICACIONES NUCLEOTÍDICAS

La desaminación accidental de una citosina no metilada da lugar a uracilo, base que no está presente en el DNA y que es reconocida por el sistema de reparación de la célula y sustituida por una citosina. Sin embargo, la desaminación de la 5-metilcitosina produce timina, base habitual del genoma; por tanto, no es reconocida por los sistemas generales de reparación. Aunque existe un sistema especial para eliminar las timinas mutantes, muchas de estas desaminaciones no se detectan y durante la evolución los residuos de citosina se pierden y se transforman en timinas, dando lugar a transiciones de CG a TA (44). Desde la década del 70 se viene trabajando con modificaciones de la citosina inducidas por agentes mutagénicos (42).

En condiciones *in vitro* se ha podido generar la conversión de citosinas no metiladas a uracilo, basándose en el tratamiento químico con agentes sulfitos que provocan una desaminación de la citosina a uracilo, esta reacción ocurre en tres pasos:

- 1) Reacción de sulfonación que origina que el agente sulfito se una al sexto carbono de la citosina originando una citosina sulfonada.
- 2) Reacción de desaminación hidrolítica que genera un uracilo sulfonado.
- 3) Desulfonación perdida de un grupo sulfonado, originándose un uracilo (43).

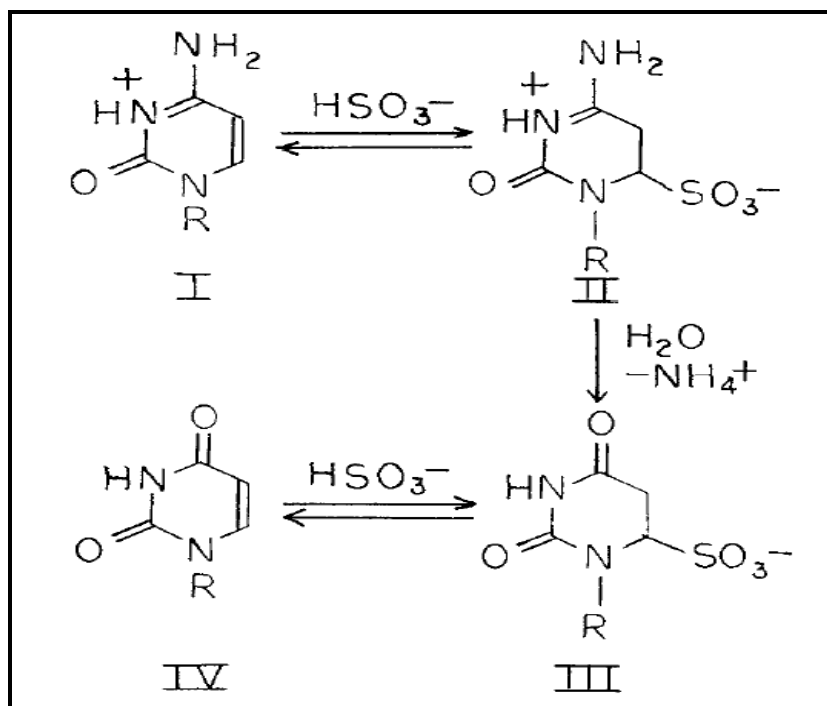


Figura III. Pasos que se desarrollan para que una citosina no metilada llegue a transformarse en uracilo mediante el tratamiento químico con iones sulfitos. Tomado de Shapiro R, y col. Journal of Biological Chemistry.

Basándose en la modificación química y aplicando la PCR, se ha podido abordar el estudio de los estados de metilación de las islas CpG presentes en el genoma humano y de otros organismos de interés. Esta metodología se conoce como metilación específica por PCR (MSP) (44) y actualmente es utilizada en el diagnóstico de enfermedades causadas por metilación génica, como algunas enfermedades neoplásicas con inactivación de oncogenes supresores de tumores (45) o en enfermedades con impresión génica tales como el Síndrome de Prader-Willi (46). La investigación de las secuencias metiladas ha contribuido en forma significativa al desarrollo del área de la epigenética (47).

Igualmente, se han desarrollado trabajos donde se aplica este principio a los tripletes CAG, obteniéndose buenos resultados para ayudar a determinar el número de tripletes presentes en el gen causante de la enfermedad de Huntington (48). Sin embargo, en el caso de grandes expansiones de tripletes o tripletes que se metilan como en el síndrome de X frágil, aun no se ha podido obtener resultados adecuados. Ello es debido a la falta de continuidad de la polimerasa al amplificar grandes expansiones, y a que las citosinas metiladas ya no cambian a uracilo, generando una alta fuerza de unión entre ambas cadenas de DNA, promoviendo la formación de estructuras secundarias y dificultando la denaturación del DNA (49).

6. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES POR TRIPLETES

El diagnóstico de tripletes que permitan conocer el número de unidades de repetición recae en las técnicas de genética molecular. El método más recomendado y empleado por varios laboratorios en el mundo para determinar el número de repeticiones trinucleotídicas es el empleo de la PCR seguida por Southern blot (50).

6.1. La reacción en cadena de la polimerasa

El método de la PCR es el más utilizado para el diagnóstico de estos microsatélites cuando se encuentran las unidades de repetición no tan expandidas. En este tipo de diagnóstico se emplea una serie de variantes que pretenden mejorar la detección de los tripletes, tales como la metodología de *long PCR*, basada en el empleo de enzimas de alta continuidad (procesividad), que buscan amplificar grandes secuencias de nucleótidos. (51).

La dificultad en el diagnóstico por PCR de estos microsatélites, radica en que las unidades de repetición suelen ser demasiado grandes, como en algunas mutaciones completas. Para el diagnóstico de los genes con estos tripletes muy expandidos, el proceso de amplificación se complica ya que la etapa de denaturación del DNA es ineficiente, pues este tipo de microsatélites generan *hairpins* de alta complejidad. Este tipo de *hairpins* no pueden ser denaturadas fácilmente, dando lugar a que la polimerasa realice una lectura incorrecta y que se salte la región que contiene la mutación. Generalmente se emplean, en expansiones pequeñas, coadyuvantes en el proceso de amplificado ya que estos estabilizan la polimerasa, evitan la formación de *hairpins* y algunos estabilizan el DNA durante el proceso de elevación de temperatura. Sin embargo, para las grandes mutaciones esto no resulta exitoso (4).

6.2. Hibridación *in situ*: Southern blot

La técnica de Southern blot es la más adecuada para el diagnóstico de genes portadores de la mutación completa, pero su uso es limitado debido a que es una tecnología cara, tanto para la implementación en sí, como para realizar el diagnóstico. Este método permite detectar la presencia de una secuencia de DNA de interés en un genoma completo o una porción de éste. Se basa en el uso de enzimas de restricción, electroforesis en gel de agarosa con el fin de separar los fragmentos de DNA de acuerdo a su longitud y después una transferencia a una membrana en la cual se efectúa la hibridación con oligonucleótido marcado con fluorescencia o radioactividad. Este tipo de metodología se ha convertido en el estándar de oro para el análisis de tripletes repetidos, debido a que no utiliza la amplificación de la secuencia de interés que contiene el triplete anormalmente expandido en el DNA (52).

6.3. Secuenciación

Es un procedimiento que tiene como paso previo un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas, cuya finalidad es la determinación del tipo y orden de los nucleótidos (A, C, G y T) de una secuencia de DNA de interés y se puede emplear para la detección del número de tripletes cuyas expansiones no son tan grandes. Sin embargo, se hace complicado realizar el secuenciamiento para microsatélites que contienen una elevada cantidad de tripletes, ya que también se fundamenta en la denaturación de la secuencia de DNA de interés, con las dificultades ya mencionadas (53).

II OBJETIVOS

1. Objetivo General

Desarrollar una metodología de detección molecular de secuencias nucleotídicas ricas en citosina metiladas y no metiladas en el gen *FMR1*.

2. Objetivos Específicos

2.1. Modificar químicamente el DNA genómico

2.2. Purificar el DNA genómico modificado

2.3. Generar cebadores específicos para tripletes repetido del gen *FMR1* modificado

III METODOS

1. TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO

Estudio de sistematización. Diseño experimental de intervención sin asignación aleatoria (54).

2. POBLACIÓN

Ocho muestras anonimizadas de DNA de voluntarios saludables (4 varones y 4 mujeres) del banco de DNA del Servicio de Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN).

3. PROCEDIMIENTO

3.1. Selección y verificación de la calidad de muestras

Se utilizó 200ul de DNA de las 8 muestras en tubos estériles de 1500 uL. Se verificó la integridad del DNA en cada muestra mediante electroforesis (PowerPac HV High-Voltage Power Supply) en gel de poliacrilamida al 4%, a 20 voltios/cm y posterior tinción con nitrato de plata. Se sembró 2ul de buffer de siembra y 2ul de DNA nuclear por cada muestra.

3.2. Cuantificación y pureza del DNA:

Se realizó por espectrofotometría de masa a longitudes de ondas de 230, 260 y 280 nm (Epoch™ Micro-Volumen Spectrophotometer System, BioTek).

3.3. Modificación nucleotídica del DNA

- a) A cada muestra de DNA que contiene entre 1–10 ug de DNA (1 000-10 000 ng), se agregó agua bidestilada llevándola a un volumen final de 18 µL. Se homogenizó lentamente y se llevó a una temperatura de 95°C por 20 min. Luego se llevó cada muestra a una cámara fría a -4°C.
- b) Posteriormente se agregó 2 µL de NaOH 3M para incubarlo por 20 min a 42°C con el fin de denaturar eficientemente el DNA.
- c) Se utilizó una solución recientemente preparada 5M de bisulfito de sodio e hidroquinona, pH 5.0. Se agregó 380 µL de la solución bisulfito/hidroquinona 5M a los 20 µL de la mezcla del DNA denaturado, con la finalidad de modificar las citosinas en uracilo.

Luego se agregó de 6-8 gotas de aceite mineral para evitar la evaporación y se incubó por 12–16 h a 50°C.

- d) Posteriormente el DNA fue purificado, cabe señalar que es necesaria la purificación de este DNA modificado, por la presencia de altas concentraciones de sales y residuos de las reacciones químicas generadas durante las modificaciones nucleotídicas y que pueden ser inhibidores de la reacción de PCR. Así mismo, es necesario generar la reacción de desulfonación, la cual se realizó agregando NaOH 3M e incubando por 15 min a 37°C el DNA que está siendo purificado, con la finalidad de retirar los grupos sulfonados provenientes del uracilo generado. Luego se agregó 75 µL de acetato de amonio 5M a pH 7.4 y 2.5 ml de etanol al 100% y llevar esta mezcla a -70°C por 0.5 a 1 hora, con el fin que precipite el DNA modificado. Posteriormente, se sometió esta mezcla a una centrifugación por 20 min, para finalmente lavar el precipitado de DNA con etanol al 70% y resuspenderlo en 30 a 50 µL en buffer TE low pH 7.5.

3.4. Purificación del DNA modificado

La purificación se realizó con el *kit* de purificación Zymo Research cuya finalidad es recuperar el DNA de la solución que contiene bisulfito. Para ello se procedió de la siguiente manera:

- a) Se agregó un volumen de 400 µl del buffer de protección a 100 µl de solución modificadora que contiene el DNA ya modificado. Se mezcló por vorteador (Mix 1).
- b) Se armó el sistema de purificación que viene con el kit, colocando la columna de purificación dentro de un micro tubo de 1.5 ml y agregando la mezcla (Mix1) dentro de la columna de purificación.

- c) Se centrifugó a 12 000 rpm por 30 segundos. Se descartó lo que se filtró por la columna.
- d) Se agregó 100 µl de Buffer de lavado a la columna de purificación. Centrifugamos 12 000 rpm por 30 segundos
- e) Se agregó 200 µl de buffer de desulfonación a la columna y se dejó reposar por 15-20 minutos a temperatura entre 20°C - 30°C. Posterior a la incubación, se centrifugó a 12 000 rpm por 30 segundos.
- f) Se agregó 200 µl de buffer de lavado a la columna. Se centrifugó a 12 000 rpm por 30 segundos. Se agregó nuevamente 200 µl de buffer de lavado y se centrifugó nuevamente por 30 segundos.
- g) Se colocó la columna en un tubo nuevo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añadió 10 µl de buffer de elución. Se centrifugó durante 30 segundos a 12.000 rpm para recuperar el DNA modificado.
- h) El DNA fue almacenado a -20°C para su posterior uso.

3.5. Detección de impurezas por electroforesis

Para ello se sembró 2 µl de las muestras de DNA modificado y purificado con 2 µl de buffer de siembra. De la misma manera se tomó 2 µl de DNA modificado y sin purificar y se le agregó 2 µl de buffer de siembra, realizando una electroforesis en las mismas condiciones.

3.6. Selección del gen candidato

Se seleccionó mediante una búsqueda bibliográfica, al gen *FMR1* relacionado con el síndrome de X Frágil por cumplir con las siguientes características: enfermedad neurodegenerativa cuyo gen en su condición patológica es portador de un microsatélite inestable ubicado en cualquier estructura del gen; que el microsatélite inestable contenga el nucleótido citosina, además del dinucleótido CG y que éste se metile tanto en su condición normal como patológica.

3.7. Caracterización estructura molecular

Empleamos la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Esta nos proporciona información de las características moleculares del gen seleccionado, es decir el tamaño del gen en pares de bases, número de intrones, número de exones, regiones traducibles, regiones no traducibles y posición nucleotídica en la que están comprendidas dichas regiones.

3.8. Caracterización de la secuencia portadora de metilación

Para caracterizar la posible metilación de la secuencia del gen *FMR1*, se utilizó el programa CpGPlot (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>), en el que se colocó la secuencia nucleotídica de la región promotora y de la región no traducible del gen.

3.9. Caracterización de la secuencia portadora del microsatélite

Se utilizó el programa MFOLD (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/>) para

obtener una aproximación de qué estructura alternativa adoptaría la secuencia analizada, para ello colocamos la secuencia de la región promotora y no traducible en formato FASTA simulando casos en donde dichas secuencias tendrían unidades de repetición de 19, 50, 200 y 2 000 tripletes.

3.10. Generación de cebadores para la secuencia portadora de metilación en el promotor (cebadores M)

Se generaron cebadores que hibriden en una región donde la secuencia nucleotídica esté constituida por citosinas y uracilos (región promotora), posteriores a la modificación química. Persisten citosinas pues en condiciones normales la región promotora se encuentra metilada en el cromosoma X inactivo. En el cromosoma X activo (no metilado), todas las citosinas han sido cambiadas a uracilo y este cebador no se hibrida. Los cebadores así generados flanquean la zona de metilación. Para esto utilizamos el programa MethPRIMER (<http://www.urogene.org/methcebadores/index1.html>), en el que colocamos las secuencias que habíamos caracterizado con el programa CpGPLOT.

3.11. Generación de cebadores para la secuencia portadora del microsatélite en la región 5'utr (cebadores T)

Se buscó generar cebadores que flanqueen la región 5'UTR que contiene citosinas no metiladas, para esto utilizamos el mismo programa MethPRIMER; en este programa se introdujo sólo la secuencia portadora del microsatélite. Estos cebadores hibridan en la región 5'UTR no metilada, donde todas las citosinas han sido cambiadas por uracilo. Igualmente, al incluirse el microsatélite con el triplete CGG, estos cebadores nos van a permitir contar el número de repeticiones.

3.12. Detección de la secuencia modificada del microsatélite y de la secuencia de metilación por PCR.

Para verificar que hay presencia de metilación realizamos una PCR con los cebadores M y para ver la presencia del microsatélite modificado y su tamaño, realizamos otra PCR con los cebadores T. La PCR se realizó en un volumen final de 20 μ L con 0.65 U/ μ l de enzima Stofell, un tampón recomendado por el fabricante, 200 μ M de cada dNTP, 2mM de MgCl₂, 0.4 μ M de cada cebador y 100 ng de DNA nuclear humano modificado.

Los ciclos de temperatura fueron: Denaturación inicial a 95°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de 1 min de temperatura a 53°C para la reacción con los cebadores M y a 43 ° C para los cebadores N, 1 min de extensión a 72°C y una denaturación a 95°C durante 1 min. Después de la reacciones de PCR, los productos fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y visualizados por tinción de plata (anexo 2).

IV: RESULTADOS

1.- CONTROL DE LA CALIDAD DEL DNA

Se tomaron 8 muestras de DNA, 4 mujeres y 4 varones. Se realizó un análisis cualitativo de integridad del DNA por electroforesis y un análisis cuantitativo por espectrofotometría para medir concentración e impurezas (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración del DNA (ng/μl) y presencia de impurezas en cada muestra (260/280).

Numero de muestra	260 Nm	280 nm	Impurezas (260/280)	Concentración (ng/μl)
M1	0.055	0.031	1.755	55.02
M2	0.096	0.053	1.817	95.861
M3	0.092	0.053	1.745	92.072
M4	0.1	0.055	1.808	20.68
M5	0.169	0.095	1.778	13.58
M6	0.178	0.103	1.721	23.56
M7	0.101	0.056	1.812	19.84
M8	0.178	0.103	1.778	24.96

En la tabla se muestra la concentración de las 8 muestras de DNA, así como la relación de pureza en cada muestra, las lecturas de cuantificación fueron realizadas por espectrofotometría con una longitud de absorbanza que va desde los 260 a 280 nm. La concentraciones de las muestras fue variable, siendo la concentración mínima de 13.6 ng/μl (M5) y la máxima de 95.9 ng/ μl (M2). Siendo las muestra M2, M4 y M7 con mayor calidad de pureza.

2.-MODIFICACION Y PURIFICACION DEL DNA NUCLEAR

La presencia de DNA modificado (pseudoRNA) se valoró indirectamente con dos mediciones consecutivas por espectrofotometría; se confirmó la presencia de DNA modificado en las 8 muestras, que tuvieron una relación de absorbanza $260/280 \geq 2$. Se muestra los resultados de tres de estas lecturas por duplicado y como ejemplo en la Tabla 2.

Tabla 2. Lectura representativa de 3 muestras. Presencia de DNA modificado (Seudo RNA). Relación de absorbancia (260/280), indica presencia de RNA si es mayor a 2.0.

Muestra leída	Longitud de onda 260	Longitud de onda 280	Presencia de RNA (260/280)	Concentración (ng/μl)
M1A	0.232	0.109	2.127	185.394
M1B	0.223	0.105	2.137	178.666
M2A	0.231	0.108	2.134	184.975
M2B	0.23	0.108	2.133	183.852
M3A	0.243	0.113	2.145	194.261
M3B	0.229	0.107	2.142	183.233

3.- DETECCIÓN DE IMPUREZAS DEL DNA MODIFICADO

Se evaluó la presencia de contaminantes en las muestras con DNA modificado mediante electroforesis (análisis cualitativo) (figura 1) y por espectrofotometría (análisis cuantitativo) (tabla 3).



Figura 1. Análisis cualitativo de DNA modificado por electroforesis.

- A) Patrón de migración característico del xilencianol (flecha Celeste) y azul de bromofenol (flecha morada) cuando el DNA no contiene contaminantes como sales de bisulfito e hidróxido de sodio. La imagen es obtenida a unos 20 minutos de migración. B) Distorsión del patrón de migración del xilencianol y azul de bromofenol cuando el DNA contiene presencia de contaminantes. La imagen es obtenida a unos 20 minutos de migración. C) Corresponde a la misma imagen B posterior a la tinción con nitrato de plata. La migración fue detenida a los 60 minutos y se ve una mayor acentuación de la distorsión del patrón de migración. A y B tomadas antes de realizar la tinción con nitrato de plata. Geles migrados en las mismas condiciones. (Gel de poliacrilamida al 6% no denaturante. Electroforesis a 200 voltios)

Tabla 3. Análisis cuantitativo de impureza en el DNA modificado.

Muestra	Lectura 1	Lectura 2	Relación de Absorbancia 260/230
M1	0.359	0.359	260
	0.166	0.167	230
	2.159	2.153	260/230
	14.343	14.356	Concentración (ng/μl)
M2	0.365	0.316	260
	0.167	0.142	230
	2.193	2.23	260/230
	14.617	12.627	Concentración (ng/μl)
M3	0.263	0.278	260
	0.125	0.125	230
	2.107	2.22	260/230
	10.535	11.139	Concentración (ng/μl)
M4	-0.001	-0.015	260
	0	-0.004	230
	15	3.563	260/230
	-0.034	-0.581	Concentración (ng/μl)

Se muestras la presencia de impurezas cuantificadas postratamiento químico del DNA. Concentración de impurezas (ng/μl). M1-M3 (Muestras de DNA modificado). Presentan concentraciones de sales cuyos rangos oscilan desde 10.4 hasta los 14.5 ng/ul. M4 Control (agua de grado molecular), con ausencia de contaminantes. Índice de absorbancia para sales fue de 260/230. Análisis realizado por espectrofotometría.

4.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL MICROSATELITE

La secuencia nucleotídica del microsatélite fue evaluada tanto en estructuras alternativas como en potenciales regiones con metilación. Se indica en cada figura los programas bioinformaticos empleados.

CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DEL MICROSATELITE EN ESTUDIO

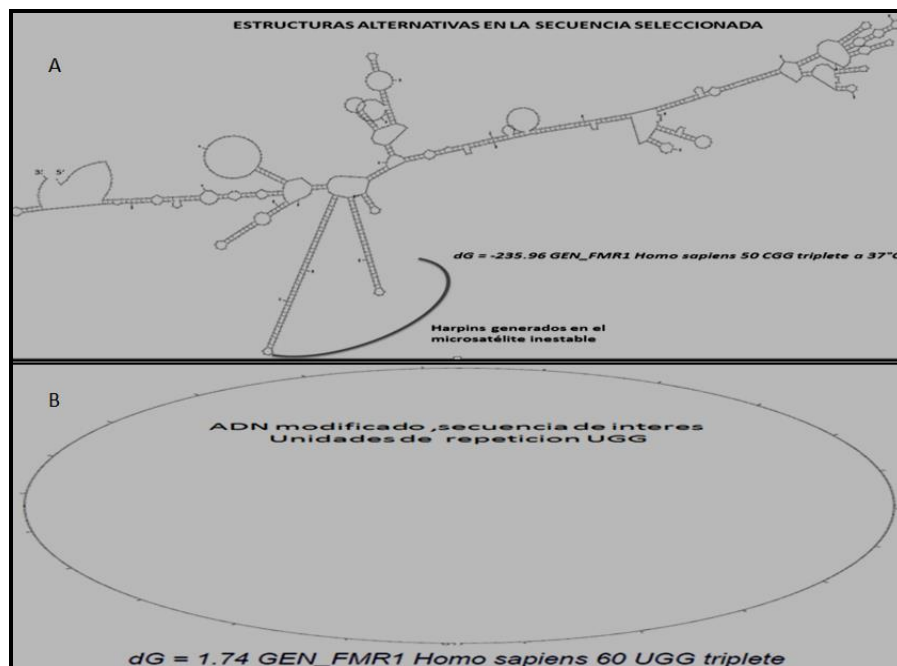


Figura 2. A) DNA normal. Estructura alternativa que adopta el microsatélite cuando éste contiene 50 tripletes CGG. Se simuló a 37°C, energía libre de Gibbs: dG - 235.96. B) DNA modificado, simulación de la estructura que adopta la secuencia de interés posterior a la modificación química. Se simuló a 94°C, energía libre de Gibbs: dG 1.74. Simulaciones realizadas para una secuencia de 5180 bp con el programa MFOLD.

CARACTERIZACION DEL PATRON DE METILACION DEL MICROSATELITE EN ESTUDIO

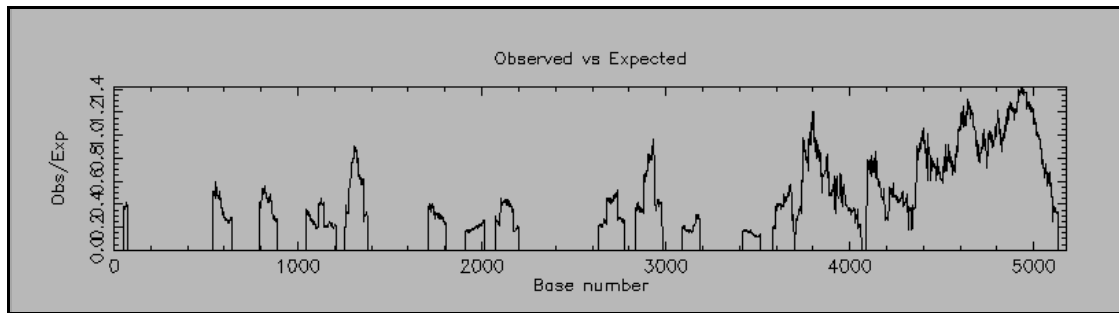


Figura 3. Potenciales Islas CpG de una región de 5180 bp del gen seleccionado. Eje Y, parámetro que define si una región determinada es una isla (<60%). Eje X, parámetro que indica el tamaño en pares de bases de la secuencia evaluada. Simulación realizada con el programa CpGplots.

5.- DISEÑO DE CEBADORES PARA LA SECUENCIA PORTADORA DE METILACIÓN (CEBADORES M) Y DEL MICROSATELITE (CEBADORES T)

Posterior a la caracterización de nuestra secuencia, se diseñaron cebadores que puedan hibridar a la secuencia modificada (las citosinas no metiladas son convertidas a uracilo). Para generar los cebadores, la secuencia de 5180 bp fue limitada a sólo 718 bp.

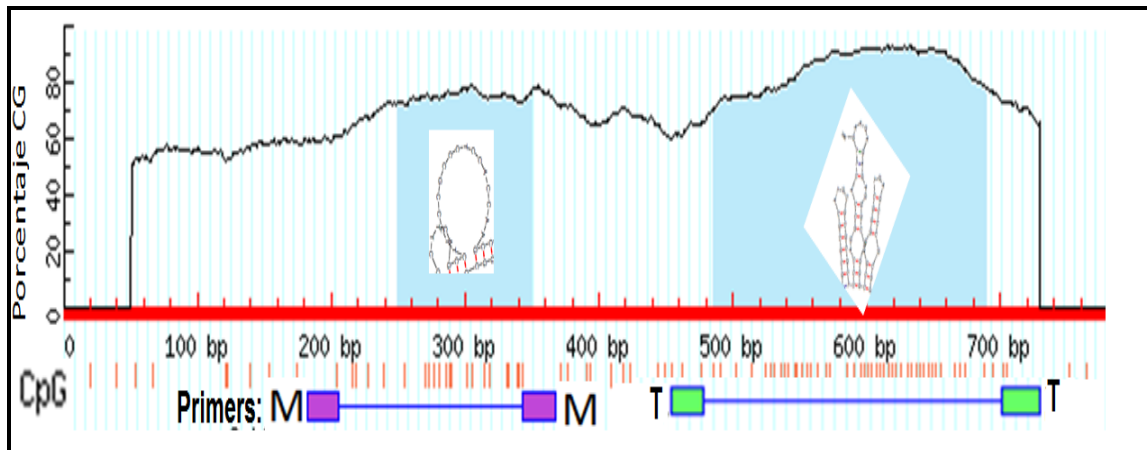


Figura 4. Estrategia adoptada para el diseño de los cebadores. En la imagen se observa: Eje Y, indicador de CG (%). Eje X, puntos de metilación (barras verticales grises) y tamaño de la secuencia en Bp. Se muestra zonas de la secuencia con estructuras alternativas (color gris). Cajas negra y gris, indican la zona de hibridación de los cebadores M y T respectivamente. Simulación realizada con el programa MethPRIMER. Se ha superpuesto la conformación más probable de cada región estudiada conteniendo islas CpG, obtenida mediante el programa mFOLD.

6.- DETECCION DE LA SECUENCIAS MODIFICADAS DEL MICROSATELITE Y DE LA SECUENCIA DE METILACION POR PCR

Para evaluar el diseño de los cebadores sobre la primera isla CpG y la modificación del microsatélite, recurrimos a las diferencias que presentan el DNA genómico de los varones y mujeres normales para el gen *FMR1*. En el caso del DNA genómico de los varones normales para el gen *FMR1*, se sabe que estos microsatélites están en un rango menor a 50 tripletes CGG y que las citosinas de la unidad repetitiva CGG no se encuentra metilados (se transforman a UGG). En el caso del DNA genómico de las mujeres normales sabemos que uno de sus cromosomas X se encuentra inactivo, lo cual provoca que la primera isla CpG del gen *FMR1* contenido en ese cromosoma se encuentre metilada. Partiendo de estas características del gen *FMR1*, se evaluó el funcionamiento de ambos cebadores. Estos fueron utilizados de forma independiente para cada reacción de PCR y posterior a la reacción de amplificación, los amplicones fueron evaluados mediante electroforesis en gel poliacrilamida no denaturante al 6% a un voltaje de 200 voltios. En la figura 5 se aprecia los amplificados de los cebadores M y T.

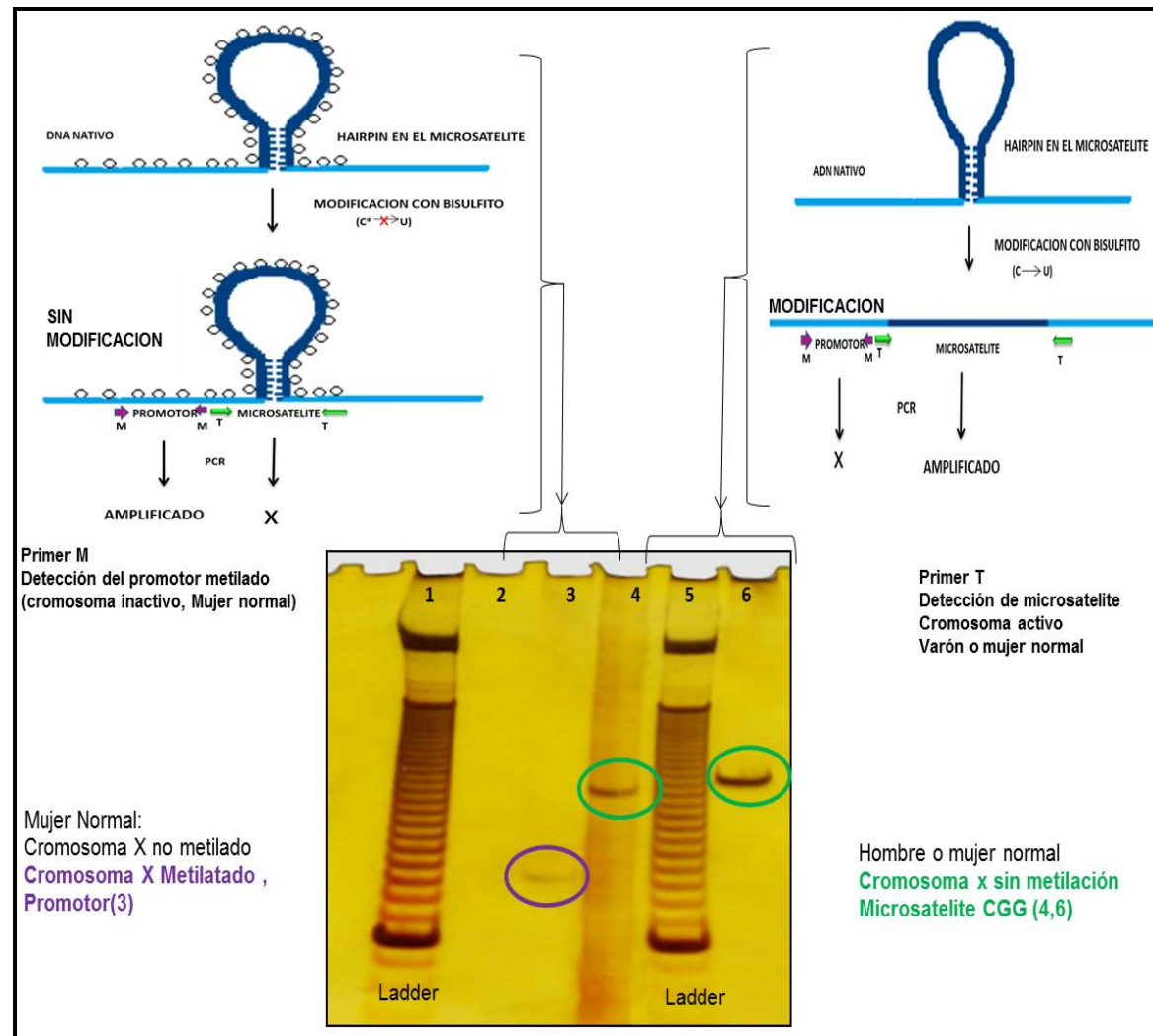


Figura 5. Se muestra los amplificados de los primer M y T. En el carril 1 y 5 se ubican los marcadores moleculares de 10 bp. En el carril 2 hay ausencia de amplificado. En el carril 3 se utilizaron los cebadores M para detectar la secuencia de metilación (Circulo morado), producto de PCR de 143pb. En el carril 4 y 6 se utilizaron los primers T para detectar el microsatélite inestable (Circulo verde) en rango normal productos de PCR de 213 y 222 pb. Gel de poliacrilamida al 6%, voltaje a 220 voltios.

V DISCUSION

Las muestras de DNA obtenidas fueron sometidas a modificación química del DNA, es decir, el cambio de las citosinas por uracilo; esta reacción de modificación con bisulfito de sodio genera una alta cantidad de residuos de sales, comprobado por electroforesis y espectrofotometría. Se purificaron las muestras ya modificadas utilizando un *kit* de purificación de sales, procedimiento corroborado por espectrofotometría y electroforesis, encontrándose presencia mínima de contaminantes. Se identificó la presencia de DNA modificado por espectrofotometría para RNA y por PCR convencional con cebadores específicos.

Se ha modificado los tripletes repetidos ricos en citosinas en el gen *FMR1* utilizando iones sulfitos que han sido obtenidos de la sal metabisulfito ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), aunque hemos determinado que la concentración adecuada de DNA a modificar es elevada (1000-10000ng/ μl), según se apreció en la Tabla 1, recuperándose sólo el 10% de la concentración de partida, posterior a la purificación del DNA modificado. Como se menciona en otras investigaciones, es muy probable

que el resto de DNA sufra reacciones de depurinación y que esto lleve a la degradación del DNA y disminución ulterior de la concentración del mismo (55) .

Modelos realizados por Hayatsu y col. en 1970 (56), encuentran contaminantes generados por la reacción de modificación de DNA que pueden afectar la reacción de PCR, por lo que es necesaria una purificación previa del producto modificado, tal como se realiza en los trabajos de Herman y colaboradores. Ellos emplean acetato de sodio para purificar el DNA modificado y posteriormente someter el DNA modificado a una reacción de PCR (44).

En la modificación química realizada, se midió la presencia de contaminantes de la reacción tanto por análisis cualitativo como cuantitativo, aunque sin caracterizar cada uno de los contaminantes. En el análisis cualitativo basado en electroforesis, se evaluó la diferencia de distorsión de la migración de las muestras de DNA modificado purificado y no purificado, encontrándose un patrón de migración característico y regular en las muestras purificadas y un patrón irregular de migración que dibuja una banda de concavidad hacia abajo (tristeza) en las muestras sin purificación. En el análisis cuantitativo realizado por espectrofotometría, a longitud de absorción de 230 y 260 nm, el análisis de estas muestras de DNA modificado sin purificar nos ha reportado concentraciones de sales mayores a 10 ng/μL, como se aprecia en la Tabla 3. De la misma manera, se analizaron bajo las mismas condiciones las muestras de DNA modificado purificadas, encontrándose concentraciones de sales menores a 2 ng/μL. Estas concentraciones de sales se relacionaron directamente con los efectos que generan los patrones de migración encontrados en el análisis cualitativo. Por último, ambos tipos de muestras (purificadas y no purificadas) fueron sometidas a reacciones de PCR para la secuencia de interés, corroborándose que aquellas con mayor presencia de contaminantes no generan amplificadas (datos no mostrados).

Con respecto a la cuantificación del pseudoRNA, se ha realizado estudios donde se limitan a purificar y posteriormente amplificar la secuencia modificada con cebadores específicos que hibridan con los uracilos del pseudoRNA, o se hace uso de *kits* que emplean colas de poliA que

se hibridan con los uracilos del pseudoRNA y posterior amplificación con cebadores específicos(58, 59). En este estudio proponemos determinar la presencia de este pseudoRNA (purificado y modificado), por análisis espectrofotométrico detectando el uracilo generado, seguido de la hibridación con cebadores específicos. La ventaja de este procedimiento frente a los dos primeros es asegurar la presencia de este pseudoRNA antes de que sea sometido a otros procesos moleculares, Por otro lado la primera técnica solo asegura estar frente a un pseudoRNA luego de la amplificación, mientras que la segunda ofrece mayor ventaja pues permite la captura y purificación del pseudoRNA en un solo paso. Sin embargo, en ninguno de los procedimientos mencionados ni en el empleado en el presente trabajo, se logra cuantificar el pseudoRNA.

La ubicación encontrada por análisis bioinformático para el microsatélite en un DNA normal fue similar a la reportada en trabajos previos de Kremer y colaboradores en el año de 1991, en donde se indica que el microsatélite se encuentra en el extremo 5' UTR del gen *FMR1*, exactamente desde la posición nucleotídica -4848 hasta el nucleótido +280 (58). Al simular el microsatélite de unidades CGG (secuencia de interés de 5180 bp) con el programa Mfold, se encontró que adopta estructuras alternativas conocidas como *hairpins* y que estas tienden a ser más grandes a mayor número de tripletes (Figura 2a). En la simulación de estas estructuras a diferentes temperaturas (desde 37° a 100°C) se observó que los *hairpins* no se denaturan con el cambio de temperatura, esto es debido a la unión por tres enlaces fuertes entre las citosinas y guaninas que presentan las unidades repetitivas del microsatélite, dato ya reportado por Samuel Chong y col. en el año 1994(59) y que nos explican la dificultad para el uso de la PCR. En nuestro estudio adicionalmente, se evaluó la tendencia a la formación de *hairpins* en función de la energía a la que se somete al microsatélite ("termodinámica del triplete") por lo que se sometió al microsatélite a simulación de diferentes temperaturas, encontrándose que la energía libre necesaria para se formen estas estructuras a 37°C es de -349.13 Kcal y a 100°C es -235.96 Kcal, demostrando que la formación de este tipo de estructura en tripletes tanto normales como patológicos es espontánea ($\Delta G < 0$) y fácil de constituir. Esta tendencia se debe

probablemente a la gran cantidad de elementos de simetría CGG presentes en el microsatélite. Este dato ha sido mencionado en los trabajos de Sidnen y col. en año 1999, que evalúa la contribución de los elementos de simetría en la formación de *hairpins* (62, 63).

Además de evaluar por medios bioinformáticos la estructura que adopta el microsatélite, también evaluamos el comportamiento de metilación de los dinucleótidos CG del microsatélite en un DNA normal. Para ello se utilizó el programa EMBOSS CpGPlot, que permitió identificar citosinas con tendencia a metilarse, dato muy importante a considerar en el diseño de cebadores específicos para la secuencia de interés modificada. En esta simulación se encontró dos potenciales islas CpG separadas por 328 bp, figura 4. La primera isla CpG está ubicada en el promotor y la segunda en el mismo microsatélite inestable, cuyo patrón de metilación es más notorio a medida que se expande el triplete. Este fenómeno ha sido observado *in vivo*, donde se observa un silenciamiento del gen *FMR1* por metilación (ausencia de la proteína FMRP1), siendo la base molecular del síndrome de X Frágil (62). En nuestro estudio *in silico* hemos encontrado que las secuencias de tripletes menores a 200 CGG, también pueden metilarse a nivel de la primera isla, considerada normalmente como no metilada. Además, no se pudo determinar en esta simulación una interacción de dependencia de metilación entre ambas islas CpG; sin embargo, *in vivo* el fenómeno de dependencia de metilación no se ha descrito en microsatélites menores a 200 CGG pero sí se ha reportado que existe una relación del 98% de dependencia entre ambas islas CpG cuando el microsatélite es mayor a 200 CGG, aunque en algunos casos la metilación de la primera isla CpG se dio sin necesidad que se metile el microsatélite o viceversa (63), fenómenos que guardarían alguna relación con lo que hemos encontrado en análisis *in silico*. La simulación del microsatélite modificado (ahora UGG) con el programa MFOLD, mostró que no hay formación de *hairpins* (figura 2b), debido posiblemente a que hay una disminución de los elementos de simetría que ya no facilitan la formación de estas estructuras. Esta disminución se debe a la conversión de las citosinas a uracilos en las unidades repetitivas, así como a la disminución en el número de enlaces fuertes entre ambas cadenas del microsatélite. Cuando se evaluó la

“termodinámica del triplete” se encontró una baja tendencia a la formación de *hairpins* ($\Delta G=1.74$), bajo las nuevas condiciones de este estudio.

Los cebadores T, obtenidos por bioinformática, flanquean el microsatélite modificado y tienen la peculiaridad de tomar como molde de amplificación solo una de las cadenas del microsatélite y de generar un fragmento de $176 + (UGG)_n$ (Anexo 3).

Los cebadores M flanquean la región promotora que contienen citosinas metiladas e hibrida con una secuencia que contiene citosinas y uracilos, generando un amplificado de 143 bp. La función de los cebadores M es detectar de manera indirecta la metilación del microsatélite cuando está anormalmente expandido y metilado. La obtención de amplificados mayores de 176 bp a partir del microsatélite estudiado garantiza la eficiencia de los pasos previos, incluyendo la modificación del DNA, su purificación, caracterización molecular y diseño de cebadores.

La presencia del amplicón generado con los cebadores T indicaría que los cambios generados por la modificación química de la citosina facilita el proceso de la PCR ya que al amplificar dicho microsatélite modificado no habría tendencia a la formación de *hairpins* y esto facilitaría la lectura correcta de la polimerasa. La denaturación del microsatélite ha sido más fácil al tener 2 enlaces fuerte en lugar de tres en cada unidad de repetición del microsatélite y por último existió la poca probabilidad de formación de *hairpins* al disminuir los elementos de simetría. Sin embargo, cuando las citosinas del microsatélite se metilan (C^*GG), la conversión de citosina a uracilo por efecto del bisulfito no ocurriría, observándose el mismo problema que genera un microsatélite normal. Por ello se utilizaron los cebadores M, que tienen la función de detectar metilación en la primera isla CpG, la cual contiene una secuencia pequeña de nucleótidos que es fácil de amplificar por PCR y que ayudarían a detectar la presencia de microsatélites mayores a 200 CGG que se encuentren metilados. Al realizar una amplificación con estos cebadores en muestras provenientes del sexo femenino, se evidenció la presencia de una amplificación en cada reacción, esto se debe a que la conversión nucleotídica no ocurrió en

unos de los cromosomas X que contiene el gen *FMR1*, fenómeno normal conocido como inactivación del cromosoma X.

Como se mencionó previamente la modificación de nucleótidos ha sido empleada para evaluar el estado de oncogenes y para enfermedades con impresión génica. Con respecto a la modificación nucleotídica y enfermedades vinculadas a expansiones de trinucleótidos, los primeros trabajos se empezaron a realizar con la enfermedad de Huntington en este trabajo se reporta la técnica de modificación química para el microsatélite cuya unidad de repetición es el triplete CAG (Enfermedad de Huntington), pero no abordan de manera detallada cuales son los beneficios que ocasiona la modificación química sobre el microsatélite, al facilitar la PCR(64). Así mismo, no se considera el fenómeno de metilación que puede ocurrir en ciertos microsatélites y su implicancia para el diseño de los cebadores. En este estudio se propone una hipótesis del efecto que produciría la modificación química sobre el microsatélite, se evalúa *in silico* el comportamiento del microsatélite pre y post modificación y además se propone una manera indirecta de detectar la metilación en el microsatélite metilado.

La finalidad de este estudio ha sido demostrar la factibilidad de esta modificación nucleotídica en el microsatélite en estudio, así como la caracterización molecular de este microsatélite pre y post modificación química y su implicancia en el diseño de los cebadores, que nos permitirían ulteriormente intentar el diagnóstico del estado de premutación y de mutación completa tanto en hombres como en mujeres. La limitante ha sido no emplear DNA que contengan microsatélites mayores a 200 CGG, muestras de DNA que tendrían que ser de personas afectadas con el síndrome de X Frágil y que hayan sido diagnosticados molecularmente por Southern blot.

Habiendo demostrado la factibilidad y utilidad de esta técnica en tripletes repetidos no metilados, es posible sugerir que el método pueda ser aplicado para el diagnóstico molecular indirecto en personas afectadas por el síndrome de X Frágil (gen con mutación completa), para ello se podría utilizar los cebadores M que son los que permiten detectar metilación cuando el microsatelite contiene más de 200 CGG, mas no podría cuantificar el número de tripletes. Sin embargo los cebadores T nos permitirían cuantificar aquellos microsatélites cuyos tripletes son menores a 200 CGG, permitiéndonos el diagnostico de este gen en su condición de premutación.

VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. CONCLUSIONES

- 1.1. Se detectaron las secuencias ricas en citosinas metiladas y no metiladas del gen *FMR1* en las muestras estudiadas, usando la metodología de modificación química con bisulfito de sodio.
- 1.2. El protocolo de modificación química del DNA empleado generó la modificación química esperada, aunque se recupera poca cantidad de DNA modificado.
- 1.3. Se modificó y purificó el DNA genómico de las muestras estudiadas para el gen *FMR1* no metilado.
- 1.4. Se generaron cebadores específicos para los tripletes repetidos del gen *FMR1*.

2. RECOMENDACIONES

- 2.1. Realizar un estudio de test de diagnóstico que evalúa el uso de esta metodología para diagnóstico molecular de la premutación y mutación completa para el síndrome de XFrágil, permitiendo darle una aplicabilidad en la práctica clínica, para el diagnóstico de hombre y mujeres portadoras (premutación) y de hombres y mujeres afectados (mutación completa), manteniendo el uso de la PCR.
- 2.2. Este principio podría ser empleado en el estudio molecular de otras enfermedades asociadas a microsatélites inestables que contengan citosinas, tales como la corea de Huntington infantil o juvenil (grandes amplificadores), la Distrofia Miotónica tipo I, algunas ataxias espinocerebelosas dominantes y la Epilepsia Mioclónica juvenil tipo I.
- 2.3. El principio empleado en la forma de evaluar metilación en el triplete repetido del gen *FMR1*, podría ser empleado en otros tipos de tripletes o microsatélites que también se metilen y correlacionarlos con los fenotipos de la enfermedad.

VII REFERENCIAS

1. Fu Y-H. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: Resolution of the Sherman paradox. *Cell*. 1991;67:1047 –1058.
2. Mirkin SM. DNA structures, repeat expansions and human hereditary disorders. *Current opinion in structural biology*. 2006;16(3):351–8.
3. Rosales-Reynoso M, Ochoa-Hernández A, Barros-Núñez P. Enfermedades causadas por expansión de tripletes. *Revista de neurología*. 2009;49(2):79–87.
4. Hećimović S, Barišić I, Mueller A, Petković I, Barić I, Ligutić I, et al. Expand long PCR for fragile X mutation detection. *Clinical genetics*. 1997;52(3):147–54.
5. Liang S, Bass HN, Gao H, Astbury C, Jamehdor MR, Qu Y. A Pseudo-Full Mutation Identified in Fragile X Assay Reveals a Novel Base Change Abolishing an EcoRI Restriction Site. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2008;10(5):469.
6. Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene*. 0000;22(42):6479–83.
7. Van Belkum A, Scherer S, Van Alphen L, Verbrugh H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998;62(2):275–93.
8. Weber JL, Wong C. Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet*. 1993 Aug;2(8):1123–8.

9. Luque. Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética: Con versión en CD ROM, 1e. Elsevier España; 2001.
10. Richard G-F, Kerrest A, Dujon B. Comparative Genomics and Molecular Dynamics of DNA Repeats in Eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008 Jan 12;72(4):686–727.
11. Strachan T, Read A. Human Molecular Genetics, Fourth Edition. 4th ed. Garland Science; 2010.
12. Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB. Introduction to Genetic Analysis (Introduction to Genetic Analysis. Ninth ed. W. H. Freeman; 2007.
13. Pasternak JJ. An Introduction to Human Molecular Genetics: Mechanisms of Inherited Diseases. 2nd ed. Wiley-Liss; 2005.
14. Rosenberg RN. The Molecular and Genetic Basis of Neurologic and Psychiatric Disease. Fourth. DiMauro S, Paulson HL, Ptáček L, Nestler EJ, editors. Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
15. Li Y, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. 2008 Oct 9;11(12):2453–65.
16. Kashi Y, King D, Soller M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics*. 1997 Feb;13(2):74–8.
17. Beckmann JS, Weber JL. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*. 1992 Apr;12(4):627–31.
18. Stallings RL. CpG suppression in vertebrate genomes does not account for the rarity of (CpG)_n microsatellite repeats. *Genomics*. 1992 Jul;13(3):890–1.
19. Schlötterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*. 2000;109(6):365–71.
20. Yu S, Mangelsdorf M, Hewett D, Hobson L, Baker E, Eyre HJ, et al. Human Chromosomal Fragile Site FRA16B Is an Amplified AT-Rich Minisatellite Repeat. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):367–74.
21. Virtaneva K, Miao J, Träskelin A-L, Stone N, Warrington JA, Weissenbach J, et al. Progressive Myoclonus Epilepsy EPM1 Locus Maps to a 175-kb Interval in Distal 21q. *Am J Hum Genet*. 1996 Jun;58(6):1247–53.
22. Richards RI. Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease. *Human molecular genetics*. 2001;10(20):2187.
23. Yrigollen CM, Tassone F, Durbin-Johnson B, Tassone F. The Role of AGG Interruptions in the Transcription of FMR1 Premutation Alleles. *PLoS ONE*. 2011 Jul 19;6(7):e21728.

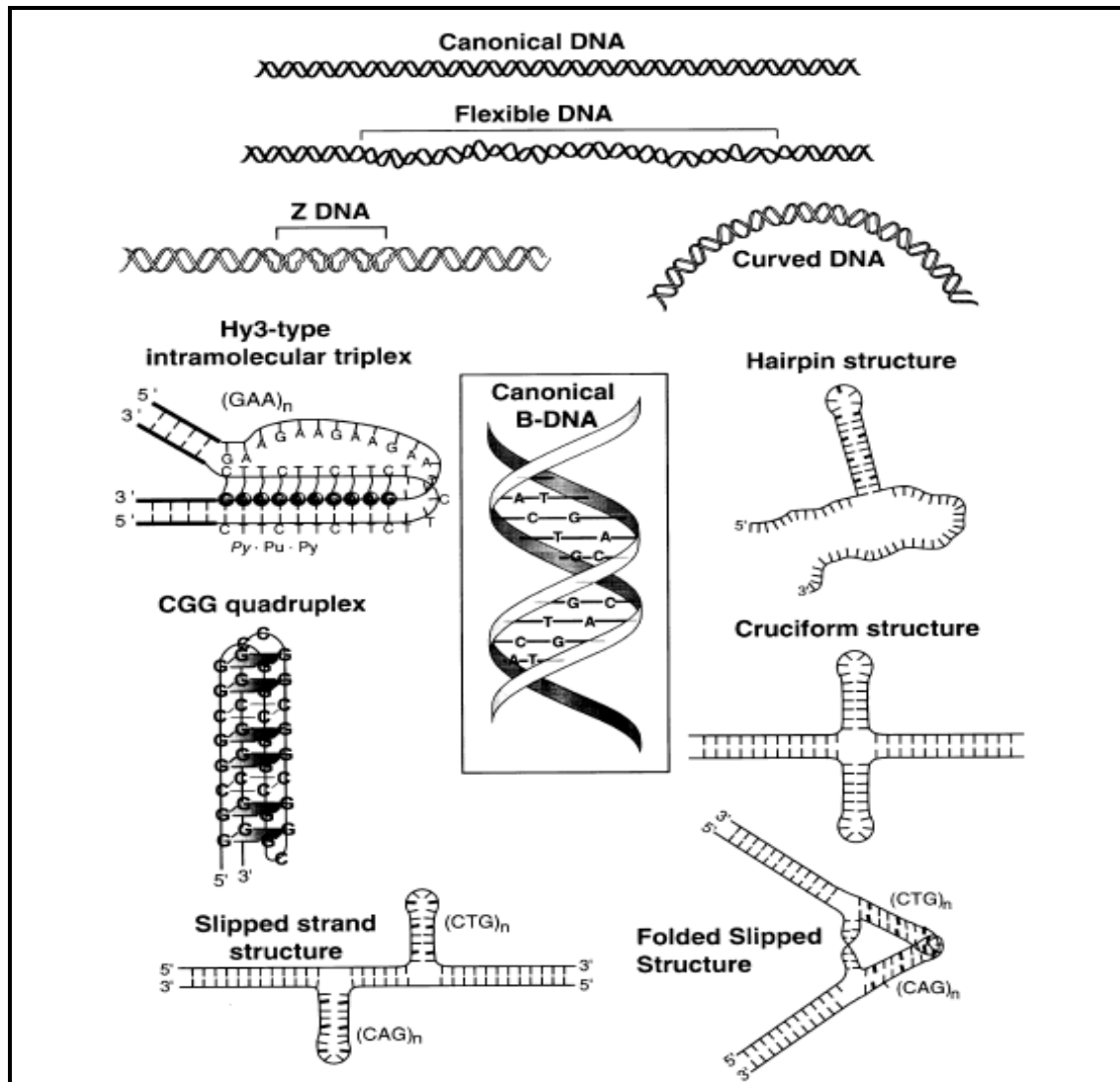
24. Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, et al. Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nature Genetics*. 1999;23(4):391–2.
25. Jacquemont S, Hagerman RJ, Hagerman PJ, Leehey MA. Fragile-X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of *FMR1*. *The Lancet Neurology*. 2007;6(1):45–55.
26. Butland SL, Devon RS, Huang Y, Mead C-L, Meynert AM, Neal SJ, et al. CAG-encoded polyglutamine length polymorphism in the human genome. *BMC Genomics*. 2007 May 22;8:126.
27. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Annals of the New York Academy of Sciences-Paper Edition*. 1995;758:12.
28. Samadashwily GM, Raca G, Mirkin SM, others. Trinucleotide repeats affect DNA replication in vivo. *Nature genetics*. 1997;17(3):298–304.
29. Sinden RR, Wells RD. DNA structure, mutations, and human genetic disease. *Current Opinion in Biotechnology*. 1992 Diciembre;3(6):612–22.
30. DNA: Alternative Conformations and Biology - Madame Curie Bioscience Database - NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2012 Jul 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6545/>
31. Chastain PD, Eichler EE, Kang S, Nelson DL, Levene SD, Sinden RR. Anomalous Rapid Electrophoretic Mobility of DNA Containing Triplet Repeats Associated with Human Disease Genes. *Biochemistry*. 1995;34(49):16125–31.
32. Pintado E, Morón F. Metilación y expresión del gen *FMR1*. *Revista de Neurología*. 2001;33(1):57–72.
33. Rodríguez Dorantes M, Téllez Ascencio N, Cerbón MA, López M, Cervantes A. Metilación del DNA: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Revista de investigación clínica*. 2004 Feb;56(1):56–71.
34. Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Names A, et al. Spl elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature*. 1994;371(6496):435–8.
35. Nakamori M, Thornton C. Epigenetic changes and non-coding expanded repeats. *Neurobiology of disease*. 2010;39(1):21–7.
36. Friso S, Lotto V, Choi S-W, Girelli D, Pinotti M, Guarini P, et al. Promoter methylation in coagulation F7 gene influences plasma FVII concentrations and relates to coronary artery disease. *Journal of Medical Genetics* [Internet]. 2012 Feb 7 [cited 2012 Feb 7]; Available from: <http://jmg.bmj.com/content/early/2012/02/06/jmedgenet-2011-100195.abstract>
37. Franco B, Ballabio A. X-inactivation and human disease: X-linked dominant male-lethal disorders. *Current opinion in genetics & development*. 2006;16(3):254–9.

38. Augui S, Filion GJ, Huart S, Nora E, Guggiari M, Maresca M, et al. Sensing X Chromosome Pairs Before X Inactivation via a Novel X-Pairing Region of the Xic. *Science*. 2007 Dec 7;318(5856):1632 –1636.
39. Duret L, Chureau C, Samain S, Weissenbach J, Avner P. The Xist RNA gene evolved in eutherians by pseudogenization of a protein-coding gene. *Science*. 2006;312(5780):1653.
40. Disteché CM. Escape from X inactivation in human and mouse. *Trends in Genetics*. 1995;11(1):17–22.
41. Warren ST. The epigenetics of fragile X syndrome. *Cell stem cell*. 2007;1(5):488–9.
42. Shapiro R, Braverman B, Louis JB, Servis RE. Nucleic Acid Reactivity and Conformation. *Journal of Biological Chemistry*. 1973 Jun 10;248(11):4060 –4064.
43. Hayatsu H, Wataya Y, Kai K. Addition of sodium bisulfite to uracil and to cytosine. *Journal of the American Chemical Society*. 1970;92(3):724–6.
44. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(18):9821.
45. Suzuki H, Watkins DN, Jair K-W, Schuebel KE, Markowitz SD, Dong Chen W, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2004 Apr;36(4):417–22.
46. Driscoll DJ, Waters MF, Williams CA, Zori RT, Glenn CC, Avidano KM, et al. A DNA methylation imprint, determined by the sex of the parent, distinguishes the angelman and Prader-Willi syndromes. *Genomics*. 1992 Aug;13(4):917–24.
47. Fraga MF, Esteller M. DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques*. 2002;33(3):632–49.
48. Panagopoulos I, Lassen C, Kristoffersson U, ÅAman P. A novel PCR-based approach for the detection of the Huntington disease associated trinucleotide repeat expansion. *Human mutation*. 1999;13:232–6.
49. Pena SDJ, Sturzeneker R. Diagnosis of the fragile X syndrome in males using methylation-specific PCR of the FMRI locus. *Genetics and molecular biology*. 1999;22(2):169–72.
50. trinucleotide repeat testing - GeneReviews™ - NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2012 Jul 13]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5191/def-item/trinucleotide-repeat-testing/>
51. Cao J, Tarleton J, Barberio D, Davidow LS. A simple fragile X PCR assay with 7-deazaguanine-substituted DNA visualized by ethidium bromide. *Molecular and cellular probes*. 1994;8(2):177–80.

52. Storm K, Handig I, Reyniers E, Oostra BA, Kooy RF, Willems PJ. Incomplete Eco RI digestion may lead to false diagnosis of fragile X syndrome. *Human genetics*. 1998;102(1):54–6.
53. Targeted mutation analysis - GeneReviews™ - NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2012 Jul 17]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5191/?rendertype=def-item&id=targeted-mutation-analysis>
54. Londoño Fernández JL. Metodología de la investigación epidemiológica [Internet]. Universidad de Antioquia; 1995 [cited 2012 Jul 13]. Available from: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=55215&indexSearch=ID>
55. Shapiro R, Weisgras JM. Bisulfite-catalyzed transamination of cytosine and cytidine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1970;40(4):839–43.
56. Hayatsu H, Wataya Y, Kai K, Iida S. Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives. *Biochemistry*. 1970;9(14):2858–65.
57. Shiraishi M, Hayatsu H. High-speed conversion of cytosine to uracil in bisulfite genomic sequencing analysis of DNA methylation. *DNA research*. 2004;11(6):409.
58. Kremer E, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, et al. Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p (CCG) n. *Science*. 1991;252(5013):1711.
59. Chong SS, Eichler EE, Nelson DL, Hughes MR. Robust amplification and ethidium-visible detection of the fragile X syndrome CGG repeat using Pfu polymerase. *American Journal of Medical Genetics*. 1994;51(4):522–6.
60. Sinden RR. Biological implications of the DNA structures associated with disease-causing triplet repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 1999 Feb;64(2):346–53.
61. Sinden RR, Potaman VN, Oussatcheva EA, Pearson CE, Lyubchenko YL, Shlyakhtenko LS. Triplet repeat DNA structures and human genetic disease: dynamic mutations from dynamic DNA. *Journal of biosciences*. 2002;27(1):53–65.
62. Chandler S, Kansagra P, Hirst M. Fragile X (CGG) n repeats induce a transcriptional repression in cis upon a linked promoter: evidence for a chromatin mediated effect. *BMC molecular biology*. 2003;4(1):3.
63. Smeets H j. m., Smits A p. t., Verheij C e., Theelen J p. g., Willemsen R, Burgt I va. de, et al. Normal phenotype in two brothers with a full *FMR1* mutation. *Hum. Mol. Genet.* 1995 Nov 1;4(11):2103–8.
64. Panagopoulos I, Lassen C, Kristoffersson U, VÅAman P. A novel PCR-based approach for the detection of the Huntington disease associated trinucleotide repeat expansion. *Human mutation*. 1999;13:232–6.

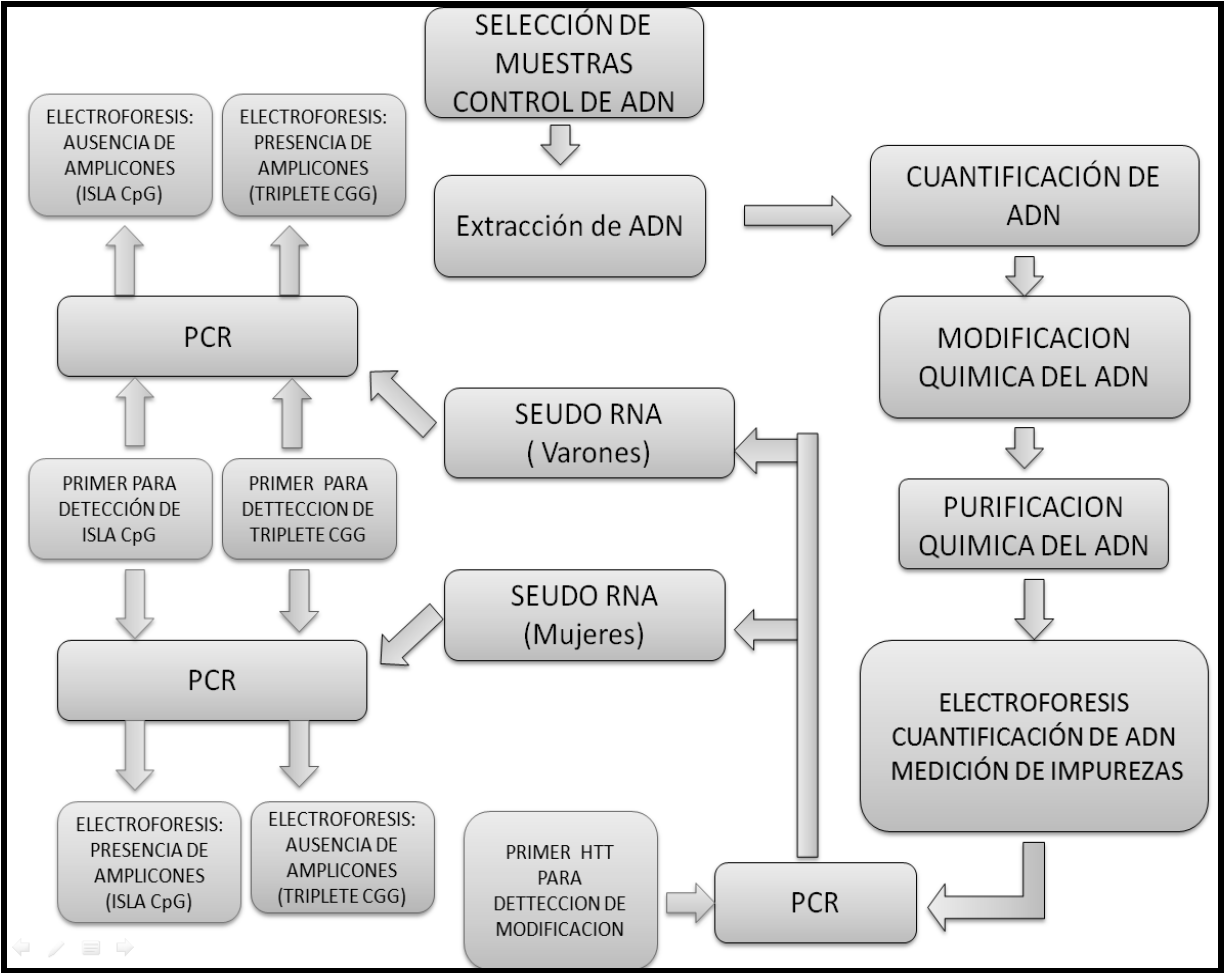
VIII: ANEXOS

ANEXO 1: Estructuras alternativas del DNA

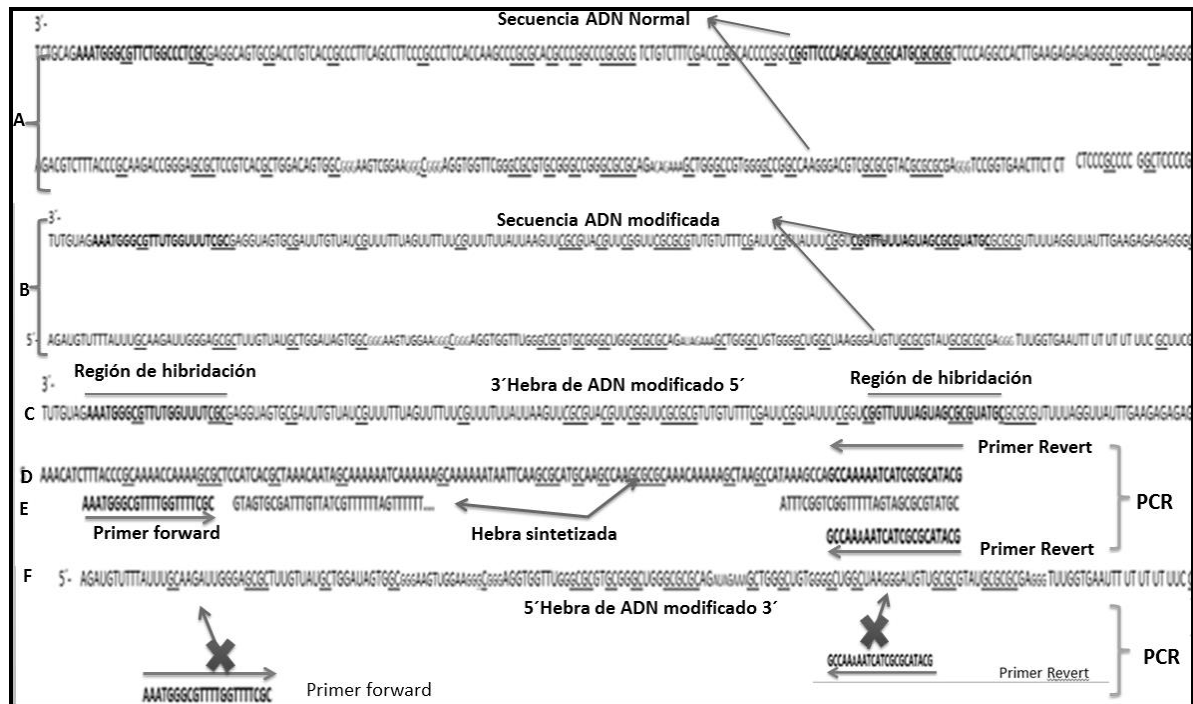


Anexo 1. Diversas estructuras conformacionales que puede adoptar los DNA repetitivos. Imagen tomada de Sinden RR y col. Journal of biosciences. 2002.

ANEXO 2: Procedimiento desarrollado en la implementación de la técnica



ANEXO 3: Estrategia de amplificación de la secuencias de interés con los cebadores diseñados



Barras pequeñas horizontales de color gris, indican metilación, Barras horizontales grandes indican la región donde hibridiza el cebadores. A: Cadena de doble cadena de DNA. B: Cadenas de DNA con presencia de uracilo en la cadena 3'-5' y 5'-3'. C: Cadena inicial de DNA modificado (3'-5) que sirve como plantilla para la síntesis de la nueva cadena (D). E: Cadena de DNA sintetizada a partir de la cadena D. F: Cadena inicial de DNA modificado (5'-3'.) que no es amplificado por los cebadores al no hibridar con ninguna región.. Flechas horizontales (Color gris) indican el lugar de hibridación y la secuencia de cebadores.

ANEXO 4: Soluciones utilizadas en los protocolos

Soluciones empleadas en la modificación química de la citosina

Como preparar la hidroquinona y el metabisulfito de sodio (también se puede emplear bisulfito de sodio):

Hidroquinona al 10 mM: Se prepara a partir de 0.055 g de hidroquinona en 50 ml de agua destilada.

Sodio Metabisulfito al 2M(pH5.5): se prepara a partir de 1.88 g de sodio metabisulfito en 5ml de agua destilada, llevando todo esto a pH de 5.0 (el pH se ajusta con hidróxido de sodio)

Hidróxido de sodio al 2M:

Solución Patrón de NaOH

NaOH 10M (50ml)

Pm= 40g/mol

10M= 10mol/L

40g ----- 1mol

10mol ----- 1000ml

x ----- 0,5

x ----- 50ml

x = 0,5 mol

x = 20g de NaOH ---> completar para 50ml (agua destilada)

A partir de esto preparamos nuestra concentración de trabajo que requerimos.

Soluciones empleadas en la electroforesis de gel de poliacrilamida

Electroforesis DNA

TAE 1x 40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA (pH: 8.0)

TBE 0.5x 45mM Tris-borato, 1mM EDTA (pH:8.0)

Tampón de carga 5x 0.25(p/v) azul bromofenol,0.25(p/v)xileno cianol,30% Glicerol

ANEXO 5: Resolución de aceptación de proyecto



PERU

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional de
Ciencias Neurológicas

*"Año de la Integración Nacional y reconocimiento de nuestra
diversidad"*

"Año de la Integración Nacional y reconocimiento de Nuestra Diversidad"

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO DE APROBACIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN


El Comité de Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, ha revisado y aprobado el Proyecto de Investigación "Detección molecular de secuencias nucleotídicas con alto contenido de citosina en el gen FMR1 - Unidad de Neurogenética- Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas 2012" presentado por el Bach. Demetrio Saúl Lindo Samanamud de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 14 de Marzo del 2012

MINISTERIO DE SALUD
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS

Dr. Rodolfo A. Badillo Carrillo
Presidente del Comité de Investigación

Dr. Rodolfo Badillo Carrillo
Presidente del Comité de Investigación

	PERU	Ministerio de Salud	Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas	"Año de la Integración Nacional y el Reconocimiento de Nuestra Diversidad"
---	-------------	--------------------------------	--	--

COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN.

CERTIFICADO DE APROBACIÓN ETICA N° 008 -2012-INCN-CIEL.

El Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, **APRUEBA** el proyecto de investigación titulado ***"DETECCIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS NUCLEOTIDICAS CON ALTO CONTENIDO DE CITOSINAS EN EL GEN FMRI, UNIDAD DE NEUROGENÉTICA INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS 2012"*** presentado por el Investigador Principal Demetrio Saúl Lindo Samanamud.

El Comité Institucional de Ética en la Investigación, realizará una visita durante la aprobación para ver las condiciones del lugar donde se realiza la investigación y el desarrollo de la misma.

El Investigador Principal, debe enviar informe semestral y final del estudio.

Lima, 03 de agosto del 2012.

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS

Dra. Rosa María Velasco Valderas
Presidenta del Comité Institucional de
Ética en Investigación

ANEXO 6: Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MUESTRA DE DNA CON FINES DE DESARROLLO DE PROCEDIMIENTOS MOLECULARES EN EL PROYECTO TITULADO: DETECCIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS NUCLEOTIDICAS CON ALTO CONTENIDO DE CITOSINAS EN EL GEN *FMR1*-UNIDAD DE NEUROGENETICA - INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS -2012

Presentación Del Equipo De Neurogenética

- Somos el equipo del servicio de Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN) con dirección en Jr. Ancash 1271- Lima, teléfono 4117779.
- Pilar Elena Mazzetti Soler (médica neuróloga, jefa del servicio)
- María Victoria Marca Ysabel (ingeniera química, jefa del laboratorio)
- Gerardo Olimpio Ortega Dávila (biólogo genetista)
- Mario Reynaldo Cornejo Olivas (médico neurólogo, investigador asociado)
- Saúl Lindo Samanamud (bachiller en biología, investigador asociado)

En nuestro trabajo diario en neurogenética, nos guiamos por la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos de la UNESCO, aprobada en 1997; la Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos de la UNESCO, aprobada el 16 de Octubre del 2003; el Informe de la Secretaría de la Organización Mundial de la Salud sobre Control de las Enfermedades Genéticas, Documento EB116/3 del 21 de Abril de 2005 y la Comunicación (2008) 679 de la Comisión de las Comunidades Europeas sobre las Enfermedades Raras: un Reto para Europa del 11 de Noviembre del 2008. Igualmente, todos los integrantes del Servicio firmamos una Declaración de Confidencialidad, con respecto a los datos que manejamos durante nuestro trabajo.

Utilidad De Este Consentimiento

El propósito de este documento es darle la información necesaria para que libremente decida si desea o no proporcionar una muestra de sangre y posterior extracción de DNA. Lea por favor la información que sigue y pregúntenos todo aquello que no le quede claro. Una vez que esté seguro de haber entendido cómo se toma la muestra de DNA y lo que se va a hacer con ella, decida si desea tomarse la muestra.

¿Qué le estamos solicitando?

Necesitamos que usted nos proporcione una muestra de sangre periférica, de una vena del brazo o mano, del cual nosotros obtendremos su DNA, para que sea empleada en pruebas para desarrollar procedimientos o análisis de genética molecular con fines diagnósticos y de investigación. Le pedimos que nos proporcione una muestra de su sangre, que luego haremos anónima, es decir, se retirará la identificación correspondiente a su nombre y sólo registraremos el género o sexo y año de nacimiento.

¿En que consiste la toma de muestra de sangre?

El DNA se encuentra en todas nuestras células y en especial en las células blancas de la sangre. Por ello, es extraído a partir de una muestra de sangre periférica, es decir, de una de las venas del brazo. Si Ud. está de acuerdo, se le tomará una muestra de sangre. Para tener una idea, las personas tenemos alrededor de 3,500 mililitros de sangre. Por ejemplo, en una donación de sangre se extrae una o dos bolsas de 250 mililitros. A usted se le tomará una muestra que corresponde a tres cucharadas de sopa o 15 mililitros. No nos es posible emplear su muestra para otros exámenes como hemoglobina, glucosa, etc. Es de uso exclusivo para estandarizar pruebas moleculares y para investigación en genética molecular. Recuerde que la muestra va a ser anónima luego de tomada y no se podrá identificar la suya de entre las otras.

¿Se requiere información clínica?

Sí, se le preguntará por antecedentes personales, antecedentes familiares y aspectos clínicos relacionados con dificultades intelectuales y otras enfermedades neurológicas crónicas, para asegurarse que no tenga usted o su familia, historia de ninguna enfermedad neurológica.

¿Cuáles son las molestias y riesgos para Ud.?

Las molestias que Ud. sentirá son algo de dolor por el pinchazo de la aguja y rara vez podría presentar un moretón en el área donde se le introdujo la aguja o bien una infección en la zona de punción. En este último caso, será atendido por un personal de la institución sin costo adicional.

¿Cuáles son los beneficios?

Usted contribuirá al desarrollo y estandarización de técnicas de genética molecular que nos permitirán realizar diagnóstico de enfermedades e investigación. No hay compensación económica por su participación en este estudio.

¿Es confidencial mi participación en este estudio?

Sí, su participación es confidencial, las muestras pasan a ser anónimas, no se entregan resultados ya que estas muestras serán utilizadas para estandarizar técnicas y no son para diagnóstico específico de enfermedad alguna. Sus datos personales (año de nacimiento y sexo) así como la muestra de sangre tendrán un código y no su nombre. Cuando los resultados de los trabajos se presentan para análisis estadístico u otros aspectos administrativos del Instituto, son manejados por personal Institucional, conscientes de la confidencialidad. Si los resultados de estos estudios son publicados o presentados en ambientes científicos, su nombre no aparecerá.

En caso de preguntas adicionales ¿con quién podría contactar?

Ud. puede contactar:

A la Dra. Rosa María Velasco Valderas, presidenta del comité Institucional de Ética en Investigación del INCN a través del numero directo 01-411-7750.

Al equipo de Neurogenética a través del numero directo 01-411-7779, en horario de 8 am a 12 pm de lunes a viernes.

Una vez que esté seguro de haber entendido todo lo anterior y no tenga más preguntas, firme por favor la autorización o consentimiento informado para tomar la muestra de sangre, para poder guardar su DNA y emplearlo en los procedimientos explicados. La firma del consentimiento informado deberá realizarse en presencia de un testigo. Ud. recibirá una copia de este documento y consentimiento.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MUESTRA DE DNA CON FINES DE DESARROLLO DE PROCEDIMIENTOS MOLECULARES EN EL PROYECTO TITULADO: DETECCIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS NUCLEOTIDICAS CON ALTO CONTENIDO DE CITOSINAS EN EL GEN *FMR1*-UNIDAD DE NEUROGENETICA - INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS -2012

Yo, _____, con DNI No. _____ declaro que he sido informado(a) por el Dr(a). _____ acerca de mi participación para desarrollar procedimientos moleculares para diagnóstico e investigación en el Servicio de Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas y he tenido la oportunidad de hacer las preguntas necesarias; estoy satisfecho (a) con las explicaciones recibidas y doy voluntariamente mi consentimiento para:

1. Que se me extraiga una muestra de sangre para la implementación de procedimientos de genética molecular del servicio.

Firma:

Huella digital

2. Que _____ (SI/NO) se almacene mi muestra en el Banco de DNA del Servicio de Neurogenética.

Firma:

Huella digital

Dirección o correo para informar conclusiones generales:

3. Profesional que toma Consentimiento:

_____ DNI: _____

Firma:

Huella digital

4. Testigo: _____ DNI: _____

Firma:

Huella digital

Lima, _____ de _____ del ____, a las _____ horas